

# Геометрия и упаковка фибриллярных компонентов межклеточного вещества МСК на разных сроках культивирования

А.Э. Мелик-Пашаев<sup>1</sup>, И.В. Андрианова<sup>1</sup>, Ю.А. Романов<sup>2,3</sup>,  
С.В. Буравков<sup>1,4</sup>, Е.Р. Андреева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup> Банк пуповинной крови «КриоЦентр», Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Резюме. Введение.** Межклеточное вещество культивируемых клеток представляет значительный интерес для исследователей, поскольку имеет ряд преимуществ перед децеллюляризованным межклеточным веществом тканей. *In vitro* возможно направленно модифицировать свойства продуцируемого межклеточного вещества за счет контролируемого изменения условий культивирования, что делает его универсальным материалом для использования в физиологических исследованиях и протоколах регенеративной медицины. Характеристика структур межклеточного вещества необходима для создания протоколов оценки качества и определения функциональных свойств получаемых бесклеточных конструкторов. Цель данной работы – охарактеризовать структурные особенности фибриллярных компонентов межклеточного вещества мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика человека на разных сроках культивирования.

**Материалы и методы.** Клетки культивировали в присутствии 2-фосфо-L-аскорбата натрия для продукции межклеточного вещества в течение 5, 7 и 10 суток. После удаления клеток фазово-контрастные фибриллярные структуры, а также окрашенные пикросириусом красным коллагеновые волокна исследовали с помощью фазово-контрастной и светлопольной микроскопии. Для морфометрии образцов межклеточного вещества использовали программы анализа изображения ImageJ и Matlab.

**Результаты.** Морфометрический анализ фазово-контрастных фибриллярных структур межклеточного вещества, а также коллагеновых волокон от мезенхимальных стромальных клеток на разных сроках показал, что длительность культивирования не влияла на геометрические параметры волокон (средний размер, общая длина и площадь). Оценка параметров сложности структуры выявила изменение микроархитектоники коллагенового каркаса за счет снижения лакунарности и увеличения изотропности.

**Закключение.** При увеличении длительности культивирования мезенхимальных стромальных клеток происходит ремоделирование коллагенового каркаса, приводящее к более упорядоченному изотропному распределению коллагеновых волокон. Соответственно, время созревания межклеточного вещества может быть использовано как фактор направленной модификации его свойств, что востребовано в исследованиях механизмов его участия в регуляции свойств клеток, а также в регенеративной медицине для создания тканеинженерных конструкторов.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, ткань пупочного канатика, межклеточное вещество, децеллюляризация, микроскопия, анализ изображений

**Для корреспонденции:** Алексей Эрнестович Мелик-Пашаев. E-mail: amelikpashaev@yandex.ru

**Для цитирования:** Мелик-Пашаев А.Э., Андрианова И.В., Романов Ю.А., Буравков С.В., Андреева Е.Р. Геометрия и упаковка фибриллярных компонентов межклеточного вещества МСК на разных сроках культивирования. Клини. эксп. морфология. 2025;14(6):29–39. DOI: 10.31088/CEM2025.14.6.29-39.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00062.

Статья поступила 11.07.2025. Получена после рецензирования 03.09.2025. Принята в печать 29.09.2025.

# Temporal dynamics of geometry and packing of fibrillar extracellular matrix of cultured MSCs

A.E. Melik-Pashaev<sup>1</sup>, I.V. Andrianova<sup>1</sup>, Yu.A. Romanov<sup>2,3</sup>, S.V. Buravkov<sup>1,4</sup>, E.R. Andreeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

<sup>2</sup> E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Cord Blood Bank "CryoCenter", Moscow, Russia

<sup>4</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** The extracellular matrix (ECM) of cultured cells is of considerable interest due to several advantages over decellularized ECM tissue. In vitro, the properties of the produced ECM can be modified directionally through controlled changes in culture conditions, rendering it a versatile material for physiological studies and regenerative medicine protocols. Comprehensive characterization of ECM structures is imperative for developing quality assessment protocols and determining the functional properties of the resulting cell-free constructs. The study aimed to characterize the time-dependent changes of ECM fibrillar components from human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSC-UCs).

**Materials and methods.** MSC-UCs were cultured in standard growth medium. Upon reaching the confluence, 2-phospho-L-ascorbate was added to stimulate ECM production. After 5, 7, and 10 days, the cell layers were decellularized. Phase-contrast fibrillar structures and collagen fibers stained with Picrosirius red were examined using phase-contrast and bright field microscopy. Morphometric analysis of the ECM samples was performed with ImageJ (Orientation J and TWOMBLI plug-ins) and Matlab (CT-Fire plug-in).

**Results.** Image analysis revealed no changes in the geometric parameters (average fiber length and width, total fiber length and area) of phase-contrast fibrillar structures or collagen fibers from MSC-UCs throughout cultivation. The changes in the microarchitecture of the collagen network manifested as a decrease in lacunarity and an increase in isotropy.

**Conclusion.** As the duration of MSC-UC cultivation increases, the collagen network remodels, which leads to a more ordered isotropic distribution of collagen fibers. Thus, the duration of ECM maturation can serve as a guideline for the targeted modulation of ECM properties. This parameter is necessary for both fundamental studies on ECM involvement in the regulation of cell functions and the fabrication of tissue engineering constructs in regenerative medicine.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stromal cells, umbilical cord tissue, extracellular matrix, decellularization, microscopy, image analysis

**Corresponding author:** Alexey E. Melik-Pashaev. E-mail: amelikpashaev@yandex.ru

**For citation:** Melik-Pashaev A.E., Andrianova I.V., Romanov Yu.A., Buravkov S.V., Andreeva E.R. Temporal dynamics of geometry and packing of fibrillar extracellular matrix of cultured MSCs. Clin. exp. morphology. 2025;14(6):29–39 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.6.29-39.

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 23-15-00062.

**Received** 11.07.2025. **Received in revised form** 03.09.2025. **Accepted** 29.09.2025.

## Введение

Межклеточное вещество (МКВ) как продукт секреторной активности культивируемых клеток привлекает все большее внимание исследователей [1–3]. МКВ от клеток имеет ряд преимуществ перед тканевым или органным за счет меньшей иммуногенности и риска переноса патогенов [4], а также возможности получения продукта для аутологичной тканевой инженерии [5]. Кроме того, МКВ может быть направленно модифицировано с целью улучшения его свойств для нужд регенеративной медицины и тканевой инженерии [6, 7]. Благодаря длительному культивированию возможно получение значительного количества МКВ, имеющего характеристики, близкие к тем, которыми оно обладает в нативной ткани. Использование таких образцов допустимо как само по себе, так и в составе биоматериалов. Так, 3D-каркасы, полностью состоящие из МКВ, были

получены путем децеллюляризации мультислойных клеточных пластов [8] и гранул [9] или путем выращивания клеток и последующей децеллюляризации на вспомогательных материалах, таких как полые трубки/волокна МКВ [10] и губки (пористые каркасы из МКВ) [11]. Эффективность применения таких конструкторов подтверждена в ряде доклинических исследований [7].

При подготовке МКВ от клеток как биомедицинского продукта исследователям необходимо оптимизировать ряд параметров: условия культивирования, протоколы децеллюляризации, оценку функциональных свойств клеток после повторного заселения на децеллюляризованные МКВ. В связи с этим становятся весьма востребованы морфологические и морфометрические подходы к оценке состояния их структур. Современные методы микроскопического анализа предоставляют широкие возможности для разработки этих подходов. Рутинно применяемая

в клеточно-биологических исследованиях фазово-контрастная микроскопия позволяет получать качественные изображения не только клеток, но и продуцируемого ими МКВ. Этот способ был использован в ряде исследований [12–18]. В работе [19] описаны результаты морфометрии волокон фибронектина, синтезированного фибробластами, отличавшихся по анизотропности. Авторы продемонстрировали корреляцию сложности структуры с величиной анизотропности. В статье [20] показано, что площадь структур МКВ иммортализованных фибробластов, полученных от мышей дикого типа, значимо больше, чем у нокаутированных по гену *Hsfl*. Применение гистологических красителей дает возможность выявить отдельные компоненты среди волокон МКВ, например окрашенные пикросириусом красным фибриллярные коллагены типа I/III [21, 22].

В данной работе проведен морфометрический анализ фибриллярного компартмента и его коллагенового компонента в МКВ культивируемых мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека на разных сроках культивирования.

## Материалы и методы

**Культивирование клеток.** В экспериментах использовали МСК из ткани пупочного канатика (МСК-ТПК), предоставленные банком пуповинной крови «КриоЦентр» в рамках договора о сотрудничестве от 18.01.2024 [23]. Клетки культивировали в стандартных условиях в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе МСО-5АС (5%  $\text{CO}_2$ , 95% воздуха) (Sanyo, Япония) в полной среде  $\alpha$ -МЕМ (Gibco, Великобритания) с 5% фетальной телячьей сыворотки (HyClone, США). Плотность посадки составляла  $3 \times 10^3$  кл/см<sup>2</sup>. После достижения 70–80% монослоя МСК-ТПК трипсинизировали и рассеивали для экспериментов на культуральные флаконы, предварительно покрытые 0,1% раствором желатина, в плотности  $8 \times 10^3$  кл/см<sup>2</sup> (рис. 1 А). После достижения 70–80% монослоя в культуральную среду добавляли 2-фосфо-L-аскорбат натрия в концентрации 10 мкг/мл (Fluka, Германия) для стимуляции продукции МКВ (рис. 1 В), после чего культивировали 5, 7 и 10 суток (рис. 1 С). Для визуализации МСК-ТПК образцы в каждой временной

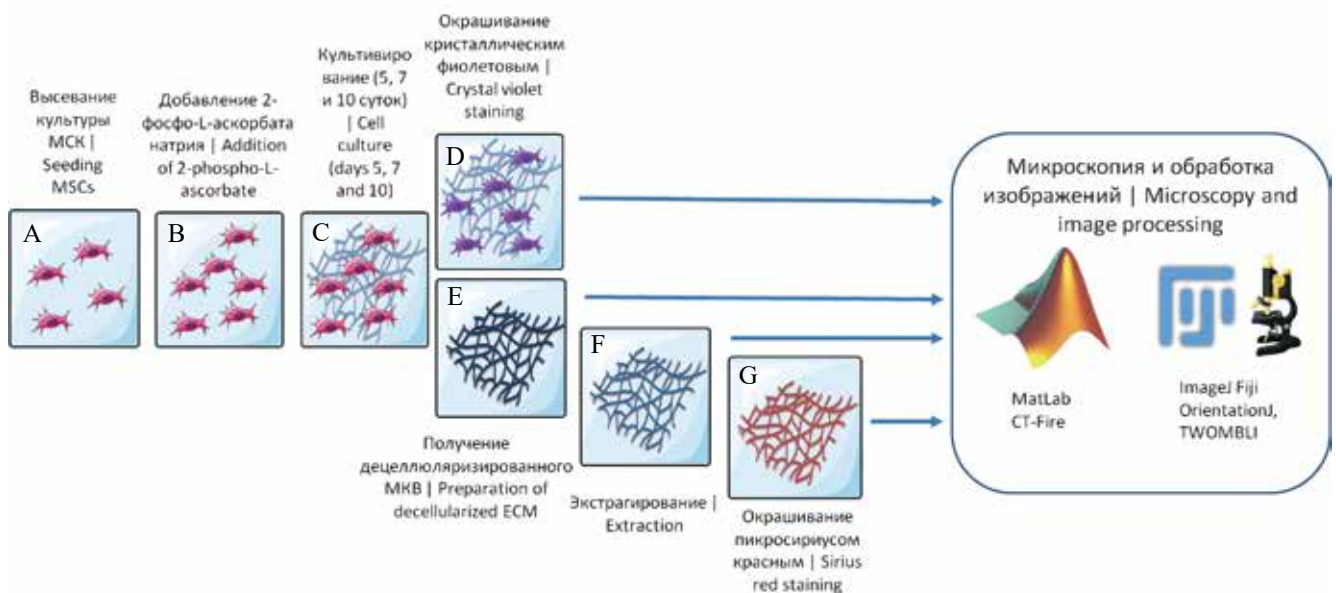


Рис. 1. Схема эксперимента.

А – МСК-ТПК высевали на культуральные флаконы, предварительно покрытые желатином для улучшения адгезии. В – на 3-е сутки в культуральную среду добавляли 2-фосфо-L-аскорбат натрия для стимуляции продукции МКВ. С – далее клетки культивировали 5, 7 и 10 суток. D – после окончания экспозиции МСК-ТПК отмывали от среды, часть образцов окрашивали кристаллическим фиолетовым. E – клетки удаляли смесью тритон X100/NH<sub>4</sub>OH для получения децеллюляризованного МКВ. F – из части полученных образцов мочевиной экстрагировали растворимые компоненты. G – для выявления коллагеновых белков препараты МКВ окрашивали пикросириусом красным. С помощью фазово-контрастной и светлопольной микроскопии были получены изображения МКВ, которые использовали для морфометрического анализа.

Схема создана с использованием измененных шаблонов Servier Medical Art, лицензия: Creative Commons Attribution 3.0 Unported; <https://smart.servier.com>

Fig. 1. Experimental design.

A – MSC-UCs were seeded into culture flasks pre-coated with gelatin to improve adhesion. B – on day 3, sodium 2-phospho-L-ascorbate was added to the culture medium to stimulate ECM production. C – the cells were then cultured for 5, 7, or 10 days. D – having been exposed, the MSC-UCs were washed with PBS, and a part of samples was stained with crystal violet. E – the cells were removed with a mixture of triton X100/NH<sub>4</sub>OH to obtain decellularized ECM. F – from a part of decellularized ECM samples, soluble components were extracted with urea. G – to detect collagen proteins, ECM samples were stained with Picrosirius red. ECM images were acquired via phase-contrast and bright field microscopy and subsequently analyzed.

The diagram was created using modified Servier Medical Art templates, licensed under Creative Commons Attribution 3.0 Unported; <https://smart.servier.com>

точке окрашивали 0,5% раствором кристаллического фиолетового (рис. 1 D).

*Получение бесклеточных образцов и удаление растворимых компонентов МКВ.* После окончания культивирования МСК-ТПК трижды промывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФБ) («ПанЭко», Россия), добавляли детергент и инкубировали 5 минут при температуре +37°C. В качестве детергента использовали изотонический раствор, содержащий 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) и 20 mM NH<sub>4</sub>OH («Самарамедпром», Россия) в ФБ. Процесс децеллюляризации контролировали с помощью фазово-контрастного микроскопа Leica DM IL LED (Leica Microsystems, Германия) (рис. 1 E). Дополнительно полученные препараты окрашивали йодистым пропидием для контроля удаления фрагментов ядер. После децеллюляризации полученные образцы МКВ тщательно промывали раствором ФБ.

Часть образцов МКВ инкубировали в 2M растворе мочевины в 150 mM растворе NaCl (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 48 часов при +4°C для удаления растворимых компонентов МКВ. После экстракции МКВ трижды промывали ФБ (рис. 1 F).

Коллагеновые белки окрашивали 0,1% раствором пикросириуса красного в насыщенной пикриновой кислоте (Sigma-Aldrich, США) 30 минут при комнатной температуре (рис. 1 G). Затем препараты промывали водой до полного удаления несвязанного красителя.

Микроскопию в светлом поле окрашенных пикросириусом или кристаллическим фиолетовым образцов проводили на микроскопе Leica DM IL (Leica Microsystems, Германия), для фазово-контрастной микроскопии фибриллярных структур использовали микроскоп Nikon Eclipse Ti-U (Nikon, Япония).

Области для анализа структур МКВ выбирали следующим образом. На дно культурального флакона нанесли крест-накрест линии, соединяя углы флакона. Далее отмечали на отрезках точки через 1 см, начиная от пересечения линий, и фотографировали изображения в выбранных точках. Такой алгоритм позволил компенсировать неравномерность роста клеток по краям и в центре флакона. Полученные изображения использовали для морфометрического анализа.

Морфометрический анализ проводили с помощью программ Matlab RunTime V9.5 (MathWorks, США) (плагин CT-Fire V3.0 Beta [24]) и ImageJ 1.54f (NIH, США) (плагины OrientationJ [25] и TWOMBLI\_v1 [19]). В работе оценивали две группы параметров. Измерение средней длины и ширины волокон, общей длины (на единицу площади) и площади, занимаемой фибриллярными структурами в исследуемой области, позволило охарактеризовать геометрические параметры отдельных волокон. Во вторую группу вошли параметры, определяющие особенности упаковки волокон, включая их количество и число пересечений, сонаправленность, неравномерность заполнения пространства (лакунарность), а также неоднородность структуры

(анизотропность). Параметр сонаправленности характеризует положение структур относительно друг друга. Чем выше значение, тем большая доля волокон направлена в одну сторону. Лакунарность характеризует наличие участков разреженности структур МКВ. Чем выше лакунарность, тем больше число и размер участков, лишенных структур МКВ. Неравномерность (анизотропность) отражает неоднородность исследуемого образца, что может коррелировать с количеством исследуемых структур МКВ, а также хаотичностью их расположения. Данные выводились в виде числовых значений исследуемых параметров для каждого изображения отдельно.

Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Данные представляли как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ) трех независимых экспериментов. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок-тестом Бонферрони при выбранном уровне значимости  $p < 0,05$ , с предварительной оценкой нормальности распределения по критерию Колмогорова–Смирнова.

## Результаты

К началу эксперимента МСК-ТПК формировали монослой (рис. 2 A). Клеточный пласт выглядел морфологически неоднородным, представляя собой чередование более плотно упакованных участков, в которых клетки не имели четкой ориентации, а также разреженных областей, в которых клетки были более сонаправлены. Такое расположение характерно для культивируемых клеток стромального дифферона и может быть охарактеризовано термином, принятым для культивируемых гладкомышечных клеток, – холмы и долины [26, 27]. При дальнейшем культивировании происходила реорганизация клеточных пластов, связанная с уплотнением МСК-ТПК в холмах (рис. 2 D, G, J). Морфометрический анализ изображений после окрашивания кристаллическим фиолетовым показал, что в начальной точке эксперимента МСК-ТПК занимали около 80% поверхности флакона. После добавления аскорбата натрия, который стимулирует не только продукцию коллагена, но и пролиферацию, площадь, занятая клетками, составила 94% на 5-е и 7-е сутки. К 10-м суткам площадь немного, но достоверно уменьшилась – до 89%, что могло быть связано с усилением компактизации монослоя, описанной ранее [27].

После децеллюляризации образцы МКВ анализировали с помощью фазового контраста (рис. 2 D, E, H, K), а также в светлом поле после окрашивания пикросириусом красным для визуализации коллагеновых волокон (рис. 2 C, F, I, L). После 3 суток культивирования структуры МКВ были представлены редко расположенными фибриллами (рис. 2 B, C).



Дальнейшее культивирование в присутствии аскорбата натрия привело к значительному увеличению представленности МКВ. На 5-е, 7-е и 10-е сутки в МКВ от МСК-ТПК с помощью фазово-контрастной микроскопии можно было визуализировать общий пул неокрашенных фибриллярных структур (рис. 2 Е, Н, К), а также

коллагеновые волокна после окрашивания пикросириусом красным (рис. 2 F, I, L). Выбранные случайным образом изображения таких фибриллярных структур были использованы для морфометрического анализа.

Для структур МКВ выбраны две группы показателей. Геометрические параметры включали средние

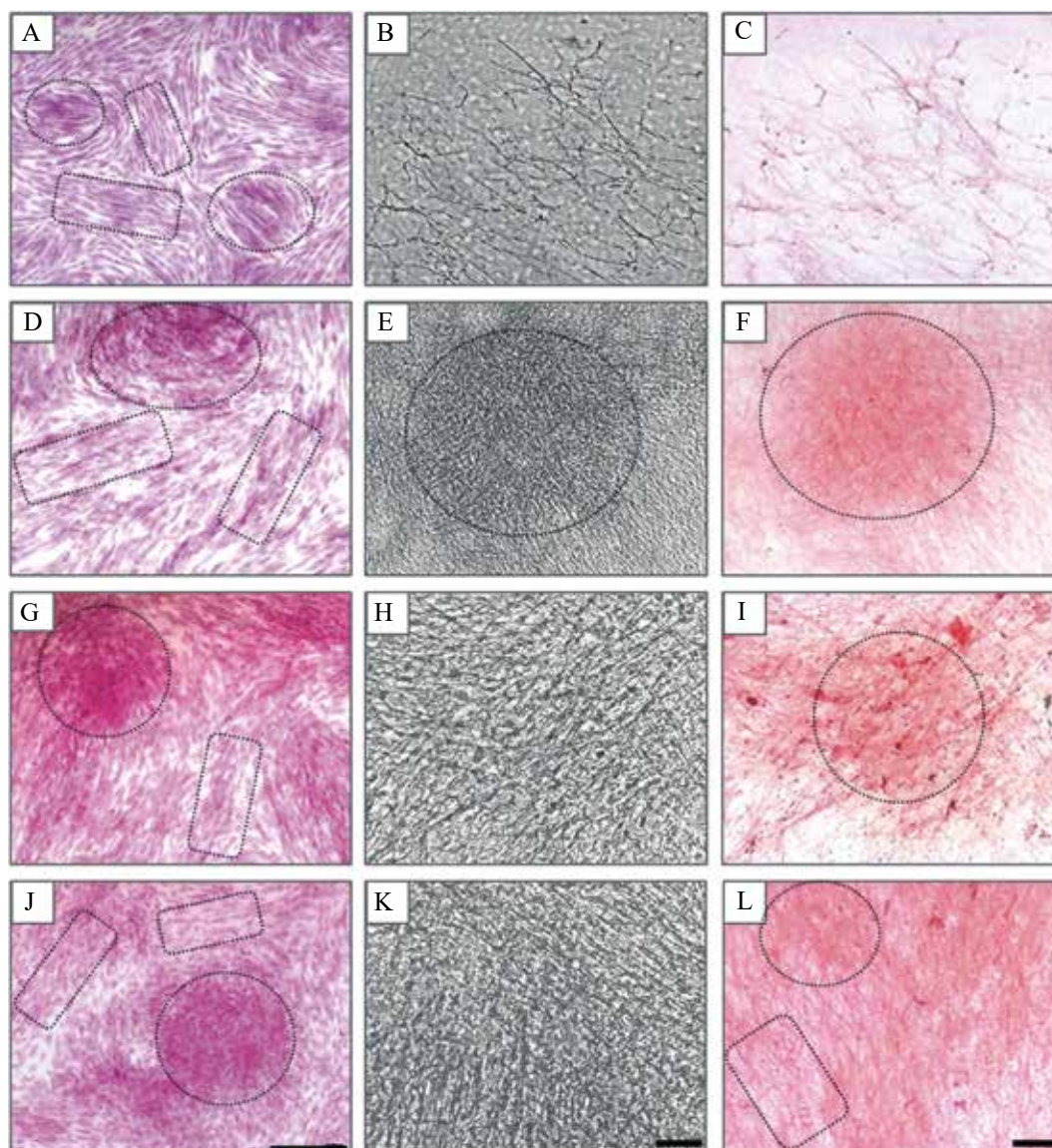


Рис. 2. Морфология МСК-ТПК и их МКВ.

А–С – перед добавлением аскорбата натрия. D–F – 5 суток, G–I – 7 суток и J–L – 10 суток культивирования. Репрезентативные изображения. Левый столбец – МСК-ТПК. Кристаллический фиолетовый. Светлое поле. Масштабный отрезок – 50 мкм. Средний столбец – структуры МКВ, фазовый контраст, масштабный отрезок – 20 мкм. Правый столбец – коллагеновые белки МКВ, пикросириус красный, светлое поле, масштабный отрезок – 20 мкм. Репрезентативные области уплотнения клеточного пласта холмов и структур МКВ под ними отмечены пунктирными овалами, области долин – пунктирными прямоугольниками

Fig. 2. Morphology of MSC-UCs and their ECM.

A–C – before sodium ascorbate was added. D–F – 5 days of cultivation, G–I – 7 days, J–L – 10 days. Representative images. The left column: MSC-UCs stained with crystal violet. Bright field, scale bar – 50  $\mu$ m. The middle column: fibrillar ECM structures, phase contrast, scale bar – 20  $\mu$ m. The right column: ECM collagen proteins. Picrosirius red, bright field, scale bar – 20  $\mu$ m. The representative areas of MSC-UCs and their ECM condensation (hills) are marked with a dotted oval. The representative areas, in which MSC-UCs and their ECM are more sparsely distributed (valleys), are marked with a dotted rectangle

длину и ширину волокон, их общую длину и площадь. Вторая группа параметров позволила оценить сложность организации фибриллярного каркаса: определить количество волокон, число точек пересечения и сонаправленность волокон, неравномерность заполнения пространства (лакунарность), а также неоднородность структуры каркаса (анизотропность). Перечисленные параметры были определены для волокон после фазового контрастирования (фазово-контрастные фибрил-

лярные структуры) и окрашенных сириусом красным коллагеновых волокон (табл. 1). Эти же измерения выполнены после экстракции растворимых компонентов МКВ с помощью мочевины (табл. 2).  
Геометрические показатели фазово-контрастных фибриллярных структур и коллагеновых волокон не изменялись в процессе культивирования (табл. 1). Анализ сложности структуры не выявил отличий в количестве и сонаправленности фазово-контрастных фибрилляр-

Таблица 1 | Table 1  
**Морфометрическая характеристика фибриллярных структур в МКВ от МСК-ТПК на разных сроках культивирования | Image analysis of fibrillar structures in ECM from MSC-UCs at different cultivation time points**

	Фазово-контрастные фибриллярные структуры   Phase contrast fibrillar structures			Коллагеновые волокна   Collagen fibers		
Время культивирования, сут   Days in culture	5	7	10	5	7	10
Геометрические параметры   Geometric parameters						
Средняя ширина, мкм   Average width, $\mu\text{m}$	33,9 $\pm$ 2,9	32,1 $\pm$ 1,5	33,9 $\pm$ 1,8	39,0 $\pm$ 5,7	41,0 $\pm$ 2,2	41,1 $\pm$ 1,5
Средняя длина, мкм   Average length, $\mu\text{m}$	380 $\pm$ 21	390 $\pm$ 25	400 $\pm$ 24	380 $\pm$ 27	400 $\pm$ 24	400 $\pm$ 19
Площадь, мм <sup>2</sup> /мм <sup>2</sup>   Area, mm <sup>2</sup> /mm <sup>2</sup>	0,21 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,05
Общая длина, мм/мм <sup>2</sup>   Total length, mm/mm <sup>2</sup>	14 $\pm$ 4	15 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	11 $\pm$ 7	11 $\pm$ 3	9 $\pm$ 3
Параметры сложности структуры   Structure complexity parameters						
Неравномерность, у.е.   Anisotropy, arb. units	–	–	–	35 $\pm$ 29	16 $\pm$ 6*	12 $\pm$ 4*
Лакунарность, у.е.   Lacunarity, arb. units	3,4 $\pm$ 2,0	2,3 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,9	38 $\pm$ 44	13 $\pm$ 4	19 $\pm$ 9#
Сонаправленность, у.е. (0–1)   Coherency, arb. units (0–1)	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1*	0,2 $\pm$ 0,1#	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
Число волокон, ед./мм <sup>2</sup>   The number of fibers, /mm <sup>2</sup>	11 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2*	13 $\pm$ 3*	19 $\pm$ 8	21 $\pm$ 4	20 $\pm$ 5
Число пересечений, ед./мм <sup>2</sup>   The number of branch points, /mm <sup>2</sup>	170 $\pm$ 80	190 $\pm$ 30	170 $\pm$ 60	60 $\pm$ 50	60 $\pm$ 30	40 $\pm$ 20

Для параметров, выраженных в условных единицах, в круглых скобках указаны минимальные и максимальные значения (если таковые имеются).  
\* – значимые отличия относительно 5-х суток, p<0,05  
# – значимые отличия относительно 7-х суток, p<0,05 |  
For parameters evaluated in arbitrary units, minimum and maximum values are shown in parentheses (if available).  
\* – significant differences relative to day 5, p<0.05  
# – significant differences relative to day 7, p<0.05

Таблица 2 | Table 2

**Морфометрические показатели фибриллярных структур МКВ от МСК-ТПК на разных сроках культивирования после экстракции растворимых в мочеvine компонентов | Qualitative parameters of the ECM fibrillar structures of MSC-UCs after extraction of urea-soluble components at different time points in culture**

	Фазово-контрастные фибриллярные структуры   Phase contrast fibrillar structures			Коллагеновые волокна   Collagen fibers		
Время культивирования, сут   Days in culture	5	7	10	5	7	10
Геометрические параметры   Geometric parameters						
Средняя ширина, мкм   Average width, $\mu\text{m}$	34,4 $\pm$ 2,7	33,4 $\pm$ 2,1	33,9 $\pm$ 2,6	40,5 $\pm$ 2,2	41,2 $\pm$ 2,9	41,7 $\pm$ 1,2
Средняя длина, мкм   Average length, $\mu\text{m}$	380 $\pm$ 16	380 $\pm$ 24	390 $\pm$ 23	390 $\pm$ 31	400 $\pm$ 22	390 $\pm$ 20
Площадь, мм <sup>2</sup> /мм <sup>2</sup>   Area, mm <sup>2</sup> /mm <sup>2</sup>	0,21 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,07*	0,11 $\pm$ 0,05*
Общая длина, мм/мм <sup>2</sup>   Total length, mm/mm <sup>2</sup>	14 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3	13 $\pm$ 3	10 $\pm$ 6	12 $\pm$ 4	8 $\pm$ 3*#
Параметры сложности структуры   Structure complexity parameters						
Неравномерность, у.е.   Anisotropy, arb. units	—	—	—	12 $\pm$ 3	16 $\pm$ 4*	10 $\pm$ 4#
Лакунарность, у.е.   Lacunarity, arb. units	2,8 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 1,3	3,2 $\pm$ 1,7	30 $\pm$ 32	15 $\pm$ 11	26 $\pm$ 16*#
Сонаправленность, у.е. (0–1)   Coherency, arb. units (0–1)	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1*	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
Число волокон, ед./мм <sup>2</sup>   The number of fibers, /mm <sup>2</sup>	12 $\pm$ 3	12 $\pm$ 4	12 $\pm$ 3	20 $\pm$ 7	21 $\pm$ 5	15 $\pm$ 4*#
Число пересечений, ед./мм <sup>2</sup>   The number of branch points, /mm <sup>2</sup>	150 $\pm$ 70	170 $\pm$ 70	150 $\pm$ 90	50 $\pm$ 40	60 $\pm$ 30	30 $\pm$ 20*#

Для параметров, выраженных в произвольных единицах, в круглых скобках указаны минимальные и максимальные значения (если таковые имеются)

\* – значимые отличия относительно 5-х суток,  $p < 0,05$

# – значимые отличия относительно 7-х суток,  $p < 0,05$  |

For parameters evaluated in arbitrary units, minimum and maximum values are shown in parentheses (if available)

\* – significant differences relative to day 5,  $p < 0.05$

# – significant differences relative to day 7,  $p < 0.05$

ных и коллагеновых волокон в разных временных точках. При этом число пересечений фазово-контрастных фибрилл было в два и более раз выше, чем коллагеновых. Лакунарность фазово-контрастных структур во всех временных точках была сходной и значимо меньше, чем коллагеновых, что указывало на более равномерное заполнение пространства фазово-контрастными волокнами. Для коллагеновых структур выявлено уменьшение лакунарности и анизотропности в ходе культивирования.

Интересные данные были получены при анализе МКВ после удаления компонентов, растворимых в мочеvine (табл. 2). Оказалось, что экстракция мочеvineй

не повлияла на геометрические параметры фазово-контрастных и коллагеновых структур, а также параметры сложности (табл. 2). Эти наблюдения позволили предположить, что растворимая фракция белков МКВ не оказывает влияния на его структурные свойства, в том числе и механическую функцию.

Как уже упоминалось, при культивировании МСК-ТПК формируют гетерогенные пласты с более плотными (холмы) и разреженными (долины) областями. Для того чтобы определить, как характеристики коллагеновых фибриллярных структур зависят от способа упаковки клеток в пласте, мы сравнили холмы и долины по описанным выше параметрам (табл. 3).

Таблица 3 | Table 3

Морфометрическая характеристика фибриллярных структур в МКВ в участках, отличающихся по упаковке МСК-ТПК (холмы и долины) | Qualitative parameters of the ECM fibrillar structures of MSC-UCs in dense (hills) and sparse (valleys) areas

Область   Area	Коллагеновые волокна   Collagen fibers	
	долины   valleys	холмы   hills
Геометрические параметры   Geometric parameters		
Средняя ширина, мкм   Average width, $\mu\text{m}$	41,0 $\pm$ 1,2	41,6 $\pm$ 1,9
Средняя длина, мкм   Average length, $\mu\text{m}$	390 $\pm$ 35	390 $\pm$ 31
Площадь, мм <sup>2</sup> /мм <sup>2</sup>   Area, mm <sup>2</sup> /mm <sup>2</sup>	0,024 $\pm$ 0,004	0,019 $\pm$ 0,007*
Общая длина, мм/мм <sup>2</sup>   Total length, mm/mm <sup>2</sup>	8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2 *
Параметры сложности структуры   Structure complexity parameters		
Неравномерность, у.е.   Anisotropy, arb. units	10,9 $\pm$ 3,8	14,8 $\pm$ 3*
Лакунарность, у.е.   Lacunarity, arb. units	6,0 $\pm$ 1,5	9,2 $\pm$ 5,3*
Сонаправленность, у.е. (0–1)   Coherency, arb. units (0–1)	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
Число волокон, ед./мм <sup>2</sup>   The number of fibers, /mm <sup>2</sup>	12 $\pm$ 1	10 $\pm$ 3
Число пересечений, ед./мм <sup>2</sup>   The number of branch points, /mm <sup>2</sup>	60 $\pm$ 20	40 $\pm$ 20*

Для параметров, выраженных в произвольных единицах, в круглых скобках указаны минимальные и максимальные значения (если таковые имеются)  
\* – значимые отличия в группах холмов и долин,  $p<0,05$  |  
For parameters evaluated in arbitrary units, minimum and maximum values are shown in parentheses (if available)  
\* – significant differences in the hills and valleys groups,  $p<0.05$

Оказалось, что в долинах были больше общая длина волокон и занимаемая ими площадь, а также количество волокон и число их пересечений ( $p<0,05$ ). Коллагеновые структуры в долинах более равномерно заполняли пространство (лакунарность была ниже, чем в холмах), а структура коллагенового каркаса была более однородна (изотропна).

Обсуждение

Нерастворимый компонент секрета МСК – межклеточное вещество – представлен фибриллярными белками, такими как коллагены, эластины, ламинины, а также гликопротеинами и протеогликанами, которые образуют гидрогели, заполняющие пространство между волокнами. Совокупность белков МКВ обеспечивает механическую поддержку клеток и выполняет многообразные регуляторные функции [28–30]. Реализация механических свойств МКВ связана с фибриллярными

компонентами, в первую очередь с коллагенами, составляющими основную часть опорных белков, формирующих каркас в тканях и органах. В условиях *in vitro* фибриллярные компоненты обеспечивают механическую информацию для клеток, модифицируя их поведение. В частности, показано, что жесткость МКВ, регулируемая состоянием фибриллярного компартмента, определяет направление дифференцировки стромальных предшественников, включая наименее коммитированные из них – МСК [31].  
При анализе временной динамики изменения структур МКВ мы использовали усредненные показатели без учета гетерогенности упаковки МКВ. При сопоставлении этих наблюдений с тем, что мы обнаружили при анализе МКВ холмов и долин, можно предполагать, что в процессе культивирования МСК-ТПК структуры МКВ претерпевают ремоделирование коллагенового каркаса, приводящее к более упорядо-



ченному изотропному распределению коллагеновых волокон.

Наши наблюдения могут быть интерпретированы с учетом результатов [19]. В этой работе авторы использовали для сравнительного анализа изображения МКВ от фибробластов с изначально отличающимися характеристиками. Часть МКВ являлась в основном изотропной с более тонкими и выровненными волокнами, но вся структура в целом была менее однородной. В анизотропных образцах отмечено увеличение лакуарности, волокна были более сонаправлены и имели меньшее число пересечений, чем изотропное МКВ. Такой профиль параметров МКВ соответствовал тому, что мы описали для коллагеновых волокон в холмах, что свидетельствовало о большей анизотропности коллагенового МКВ, тогда как структуры в долинах были более изотропными. Дополнительным подтверждением более высокой анизотропности волокон в холмах служило уменьшение их общей длины и площади волокон, что привело к увеличению лакуарности.

*In vivo* в нормальных и патологических тканях описаны различные паттерны упаковки МКВ. Известно, что выровненные линейные волокна МКВ обеспечивают сопротивление растяжению в направлении выравнивания, а также помогают направлять миграцию клеток. Переход изотропных изогнутых волокон к более выровненным характерен для агрессивных форм рака [32].

Анизотропность МКВ, полученного из культивируемых клеток, отражает неоднородность расположения волокон (таких, как коллаген) и других структурных компонентов МКВ, которые не ориентированы случайным образом, а выровнены в определенном направлении, что приводит к различиям в жесткости, прочности или других механических свойствах в зависимости от того, в каком направлении они измеряются [33]. В работе [33] проанализировано поведение фибробластов в течение недели после достижения контактного торможения. Авторы продемонстрировали, что выравнивание клеток и, как следствие, МКВ происходило еще до достижения монослоя. При дальнейшем культивировании обнаружено значимое снижение анизотропии, то есть коллагеновый каркас становился более упорядоченным (изотропным). Эти данные хорошо согласуются с нашими наблюдениями относительно увеличения изотропности фибриллярных структур МСК-ТПК, в том числе коллагеновых волокон.

Оценка морфологии является одним из наиболее широко используемых подходов для определения качества клеточного децеллюляризованного МКВ. В нашей работе впервые предложен комплексный подход к количественной характеристике волокон и показана его эффективность для сравнения свойств МКВ в разных экспериментальных условиях. Так, были охарактеризованы особенности МКВ после применения различных протоколов децеллюляризации [18]. В нашей обзорной статье [3] в качестве иллюстраций

приведены данные количественной оценки структур МКВ на изображениях, полученных с помощью различных микроскопических методов. Также была описана корреляция высокой жесткости МКВ, которая наблюдается в условиях гипоксии, с повышенной выровненностью волокон и увеличенной анизотропностью [34], что свидетельствует о биомеханических свойствах МКВ.

## Заключение

В данной работе мы провели морфометрический анализ фазово-контрастных фибриллярных структур межклеточного вещества, а также коллагеновых волокон от мезенхимальных стромальных клеток на разных сроках культивирования. Мы показали, что при длительном культивировании клеток, достигших контактного торможения, не происходит изменения геометрических параметров фибриллярных структур межклеточного вещества, однако снижается лакуарность и анизотропность, в том числе основной составляющей – коллагеновых волокон. Анализ влияния характера упаковки фибриллярных структур межклеточного вещества на состав и свойства гликопротеинов и протеогликанов растворимой части представляет интерес с точки зрения регенеративной медицины для создания тканеинженерных конструкций.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.Р. Андреева,

И.В. Андрианова.

Сбор и обработка материалов – А.Э. Мелик-Пашаев, Е.Р. Андреева.

Написание текста – Е.Р. Андреева, А.Э. Мелик-Пашаев.

Редактирование – Ю.А. Романов, С.В. Буравков, И.В. Андрианова.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.R. Andreeva, I.V. Andrianova.

Collected the data and performed the analysis – A.E. Melik-Pashaev, E.R. Andreeva.

Wrote the paper – E.R. Andreeva, A.E. Melik-Pashaev.

Edited the manuscript – Yu.A. Romanov, S.V. Buravkov, I.V. Andrianova.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## Литература/References

1. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2506–19. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010.
2. Ragelle H, Naba A, Larson BL, Zhou F, Pijic M, Whittaker CA et al. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices. *Biomaterials*. 2017;128:147–59. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.008.
3. Melik-Pashaev AE, Matveeva DK, Buravkov SV, Atyakshin DA, Kochetova ES, Andreeva ER. Microscopy and image analysis of

- cell-derived decellularized extracellular matrix. *Cell Tiss Biol*. 2025;19:33–47. DOI: 10.1134/S1990519X25010043.
4. Zhang W, Yang J, Zhu Y, Sun X, Guo W, Liu X et al. Extracellular matrix derived by human umbilical cord-deposited mesenchymal stem cells accelerates chondrocyte proliferation and differentiation potential in vitro. *Cell Tissue Bank*. 2019;20(3):351–65. DOI: 10.1007/s10561-019-09774-7.
  5. Lu H, Hoshiba T, Kawazoe N, Chen G. Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2011;32(10):2489–99. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.016.
  6. Ушаков Р.Е. Потенциал биомедицинского использования децеллюляризованных матриц культивируемых клеток. *Citologia*. 2023;65(1):11–19. DOI: 10.31857/S004137712301011X.  
Ushakov RE. The potential of decellularized cell-derived matrices for biomedical applications. *Tsitologiya*. 2023;65(1):11–19 (In Russ.). DOI: 10.31857/S004137712301011X.
  7. Assunção M, Dehghan-Baniani D, Yiu CHK, Später T, Beyer S, Blocki A. Cell-derived extracellular matrix for tissue engineering and regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:602009. DOI: 10.3389/fbioe.2020.602009.
  8. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet*. 2009;373(9673):1440–6. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60248-8.
  9. Zwolinski CM, Ellison KS, DePaola N, Thompson DM. Generation of cell-derived three dimensional extracellular matrix substrates from two dimensional endothelial cell cultures. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(5):589–95. DOI: 10.1089/ten.TEC.2010.0619.
  10. Roberts K, Schluns J, Walker A, Jones JD, Quinn KP, Hestekin J et al. Cell derived extracellular matrix fibers synthesized using sacrificial hollow fiber membranes. *Biomed Mater*. 2017;13(1):015023. DOI: 10.1088/1748-605X/aa895c.
  11. Wolchok JC, Tresco PA. The isolation of cell derived extracellular matrix constructs using sacrificial open-cell foams. *Biomaterials*. 2010;31(36):9595–603. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.072.
  12. Franco-Barraza J, Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E. Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol*. 2016;71:10.9.1–10.9.34. DOI: 10.1002/cpcb.2.
  13. Block T, Creech J, da Rocha AM, Marinkovic M, Ponce-Balbuena D, Jiménez-Vázquez EN et al. Human perinatal stem cell derived extracellular matrix enables rapid maturation of hiPSC-CM structural and functional phenotypes. *Sci Rep*. 2020;10(1):19071. DOI: 10.1038/s41598-020-76052-y.
  14. Holuigue H, Lorenc E, Chighizola M, Schulte C, Varinelli L, Dera-co M et al. Force sensing on cells and tissues by atomic force microscopy. *Sensors (Basel)*. 2022;22(6):2197. DOI: 10.3390/s22062197.
  15. Lu H, Hoshiba T, Kawazoe N, Chen G. Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(9):2507–16. DOI: 10.1002/jbm.a.34150.
  16. Riis S, Hansen AC, Johansen L, Lund K, Pedersen C, Pitsa A et al. Fabrication and characterization of extracellular matrix scaffolds obtained from adipose-derived stem cells. *Methods*. 2020;171:68–76. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.07.004.
  17. Viji Babu PK, Rianna C, Mirastschijski U, Radmacher M. Nano-mechanical mapping of interdependent cell and ECM mechanics by AFM force spectroscopy. *Sci Rep*. 2019;9(1):12317. DOI: 10.1038/s41598-019-48566-7.
  18. Kochetova ES, Matveeva DK, Melik-Pashayev AE, Andreeva ER, Romanov YuA, Buravkova LB. Selection of optimal protocol for decellularization of extracellular matrix of mesenchymal stromal cells of human umbilical cord tissue. *Bull Exp Biol Med*. 2025;178(4):535–40. DOI: 10.1007/s10517-025-06369-z.
  19. Wershof E, Park D, Barry DJ, Jenkins RP, Rullan A, Wilkins A et al. A FIJI macro for quantifying pattern in extracellular matrix. *Life Sci Alliance*. 2021;4(3):e202000880. DOI: 10.26508/lsa.202000880.
  20. Levi-Galibov O, Lavon H, Wassermann-Dozorets R, Pevsner-Fischer M, Mayer S, Wershof E et al. Heat Shock Factor 1-dependent extracellular matrix remodeling mediates the transition from chronic intestinal inflammation to colon cancer. *Nat Commun*. 2020;11(1):6245. DOI: 10.1038/s41467-020-20054-x.
  21. Trackman PC, Saxena D, Bais MV. TGF- $\beta$ 1- and CCN2-stimulated sirius red assay for collagen accumulation in cultured cells. *Methods Mol Biol*. 2017;1489:481–5. DOI: 10.1007/978-1-4939-6430-7\_39.
  22. Murphy KJ, Reed DA, Vennin C, Conway JRW, Nobis M, Yin JX et al. Intravital imaging technology guides FAK-mediated priming in pancreatic cancer precision medicine according to Merlin status. *Sci Adv*. 2021;7(40):eabh0363. DOI: 10.1126/sciadv.abh0363.
  23. Romanov YuA, Balashova EE, Volgina NE, Kabaeva NV, Dugina TN, Sukhikh GT. Optimized protocol for isolation of multipotent mesenchymal stromal cells of the human umbilical cord. *Bull Exp Biol Med*. 2015;160(1):148–54. DOI: 10.1007/s10517-015-3116-1.
  24. Liu Y, Keikhosravi A, Mehta GS, Drifka CR, Eliceiri KW. Methods for quantifying fibrillar collagen alignment. *Methods Mol Biol*. 2017;1627:429–51. DOI: 10.1007/978-1-4939-7113-8\_28.
  25. Rezakhanliha R, Agianniotis A, Schrauwen JT, Griffa A, Sage D, Bouten CV et al. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech Model Mechanobiol*. 2012;11(3-4):461–73. DOI: 10.1007/s10237-011-0325-z.
  26. Majack RA. Beta-type transforming growth factor specifies organizational behavior in vascular smooth muscle cell cultures. *J Cell Biol*. 1987;105(1):465–71. DOI: 10.1083/jcb.105.1.465.
  27. Nimiritsky P, Novoseletskaia E, Ereminchev R, Alexandrushkina N, Karagyaur M, Vetrovoy O et al. Self-organization provides cell fate commitment in MSC sheet condensed areas via ROCK-dependent mechanism. *Biomedicines*. 2021;9(9):1192. DOI: 10.3390/biomedicines9091192.
  28. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2506–19. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010.
  29. Ragelle H, Naba A, Larson BL, Zhou F, Prijic M, Whittaker CA et al. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices. *Biomaterials*. 2017;128:147–59. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.008.

30. *Lozito TP, Kuo CK, Taboas JM, Tuan RS.* Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. *J Cell Biochem.* 2009;107(4):714–22. DOI: 10.1002/jcb.22167.
31. *Yang L, Ge L, van Rijn P.* Synergistic effect of cell-derived extracellular matrices and topography on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12(23):25591–603. DOI: 10.1021/acsami.0c05012.
32. *Zeitoune AA, Luna JS, Salas KS, Erbes L, Cesar CL, Andrade LA et al.* Epithelial ovarian cancer diagnosis of second-harmonic generation images: a semiautomatic collagen fibers quantification protocol. *Cancer Inform.* 2017;16:1176935117690162. DOI: 10.1177/1176935117690162.
33. *Park D, Wershof E, Boeing S, Labernadie A, Jenkins RP, George S et al.* Extracellular matrix anisotropy is determined by TFAP2C-dependent regulation of cell collisions. *Nat Mater.* 2020;19(2):227–38. DOI: 10.1038/s41563-019-0504-3.
34. *Matveeva DK, Buravkov SV, Andreeva ER, Buravkova LB.* Hypoxic extracellular matrix preserves its competence after expansion of human MSCs under physiological hypoxia *in vitro*. *Biomimetics.* 2023;8(6):476. DOI: 10.3390/biomimetics8060476.

### Информация об авторах

Алексей Эрнестович Мелик-Пашаев – младший научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Ирина Вячеславовна Андрианова – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Юрий Аскольдович Романов – профессор, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза НИИ экспериментальной кардиологии НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова, директор по научным исследованиям банка пуповинной крови «КриоЦентр».

Сергей Валентинович Буравков – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ – ИМБП РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории анализа изображений клеточных структур, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Елена Ромуальдовна Андреева – профессор, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

### Author information

Alexey E. Melik-Pashaev – Junior Researcher, Laboratory of Cell Physiology, Institute of Biomedical Problems.

<https://orcid.org/0009-0002-1253-8177>

Irina V. Andrianova – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Cell Physiology, Institute of Biomedical Problems.

<https://orcid.org/0000-0002-4986-0920>

Yuri A. Romanov – Professor, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Angiology, Institute of Experimental Cardiology,

E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology; Director of Scientific Research, Cord Blood Bank “CryoCenter”.

<https://orcid.org/0000-0003-3748-6860>

Sergey V. Buravkov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Muscle Activity Physiology, Institute of Biomedical Problems;

Leading Researcher, Laboratory of Cell Structures Image Analysis, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<https://orcid.org/0000-0002-1461-464X>

Elena R. Andreeva – Professor, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Cell Physiology, Institute of Biomedical Problems.

<https://orcid.org/0000-0002-1000-5804>