

УДК 57.085.23

ОСТЕОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ОСТЕОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* АССОЦИИРОВАНА СО СЛАБЫМ ИЗМЕНЕНИЕМ ИХ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ

© 2023 г. И. А. Хворова¹, Д. А. Костина¹, Б. Р. Зайнуллина², Е. А. Фефилова¹, Е. С. Громова¹, Р. М. Тихилов³, С. А. Божкова³, А. П. Середа³, В. В. Карелкин³, А. Б. Малашичева¹, А. А. Лобов¹, *

¹Лаборатория регенеративной биомедицины, Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Ресурсный центр “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ, Санкт-Петербург, 199034 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, 195427 Россия

*E-mail: lobov@incras.ru

Поступила в редакцию 25.05.2022 г.

После доработки 02.07.2022 г.

Принята к публикации 03.07.2022 г.

Заживление переломов представляет собой сложный процесс, при котором основными источниками клеток-предшественников остеобластов становятся надкостница и эндост. Однако клеточные механизмы и сигнальные каскады, лежащие в основе начальных стадий дифференцировки предшественников остеобластов во взрослой кости, до сих пор недостаточно изучены. Поэтому мы провели протеомный анализ первичной культуры изолированных остеобластов человека из бедренной кости взрослых доноров в недифференцированных условиях и на пятый день остеогенной дифференцировки *in vitro*. Это ранняя временная точка, при которой еще не наблюдается минерализация внеклеточного матрикса. В протеомный анализ были включены 1612 белков, идентифицированных как минимум по двум пептидами. Данные доступны через ProteomeXchange с идентификатором PXD033697. Несмотря на то, что минерализация матрикса начинается только после индукции остеогенной дифференцировки, мы выявили неожиданно слабый физиологический сдвиг, связанный со снижением пролиферативной активности клеток и изменением белков, участвующих в секреции и организации внеклеточного матрикса. Мы показали, что при культивировании в стандартных условиях в остеобластах выявляются маркеры поздних стадий остеогенной дифференцировки, в том числе BMP-2/4, остеокальцин, остеопонтин и RUNX2. Следовательно, дальнейшая дифференцировка, необходимая для минерализации матрикса, требует минимальных физиологических изменений.

Ключевые слова: остеобласты, остеогенная дифференцировка, протеомика дробовика, кость, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0041377123010066, **EDN:** GPCARC

Остеобласты представляют собой специализированные мезенхимные клетки, ответственные за продукцию костного внеклеточного матрикса и его минерализацию. *In vivo* остеогенная дифференцировка происходит, главным образом, во время формирования кости путем эндохондральной или внутримем-

бранозной оссификации. В начале обоих процессов мезенхимные клетки начинают уплотняться. При внутримембранозной оссификации мезенхимные клетки непосредственно дифференцируются в остеобласты, начинают продуцировать остеоид (костный ВКМ) и формируют центр окостенения. При эндохондральной оссификации, наоборот, происходит хондрогенная дифференцировка уплотненных мезенхимных клеток, что приводит к образованию надхрящницы. Затем хондроциты в области диафиза гипертрофируются и продуцируют факторы роста эндотелия сосудов, привлекающие сосуды. Наконец, мезенхимные клетки и гипертрофированные хондроциты подвергаются остеогенной дифференцировке (Lobov, Malashicheva, 2022).

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, ВЭЖХ-МС-МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; МСК — мезенхимные стволовые клетки, УВЖХ — ультра высокоэффективная жидкостная хроматография; FDR — частота ложного обнаружения; PCA — метод главных компонент; ФСБ — фосфатно-солевой буферный раствор; sPLS-DA — разреженный дискриминантный анализ на основе частных наименьших квадратов; ФБС — фетальная бычья сыворотка.

Во взрослом организме аналогичные процессы могут происходить при заживлении переломов костей. В отличие от формирования кости, основным источником клеток-предшественников остеобластов для заживления переломов становятся надкостница и эндост. Мезенхимные стволовые клетки костного мозга также участвуют в этом процессе, но не в качестве основного источника клеток для остеобластов. Их основная функция заключается в секреции цитокинов и хемокинов, которые способствуют остеогенной или хондрогенной дифференцировке (Bragdon, Bahney, 2018; Matthews et al., 2021). Процесс заживления кости зависит от механических воздействий и стабильности микроокружения. Поэтому клетки-предшественники дифференцируются в остеобласты преимущественно вдоль эндостальной и периостальной поверхностей и способствуют заживлению перелома за счет внутримембранного сращения кости. В щели перелома подвижность выше, поэтому периостальные клетки-предшественники дифференцируются в хондроциты, образуя мягкую хрящевую мозоль, которая соединяет концы сломанной кости (Bahney et al., 2019). Далее по мере заживления перелома хондроциты трансформируются в остеобласты, которые участвуют в окончательном восстановлении кости.

В то время как остеогенная дифференцировка в зрелой кости обычно происходит от других клеток-предшественников, большинство экспериментов по остеогенной дифференцировке *in vitro* проводились на модели МСК (Lobov, Malashicheva, 2022). *In vitro* остеогенная дифференцировка МСК происходит в три этапа: пролиферация, созревание ВКМ и минерализация ВКМ (Pitkänen, 2020).

В отличие от МСК, предшественники остеобластов могут иметь относительно высокие уровни экспрессии остеокальцина, щелочной фосфатазы и коллагена I типа, поскольку они проходят через остеогенную дифференцировку. Тем не менее, предшественники остеобластов все еще способны пролиферировать и могут в дальнейшем дифференцироваться. Когда остеобласты заканчивают участвовать в процессе костеобразования, у них есть три возможных пути развития: они подвергаются апоптозу, становятся покоящимися остеобластами или остеоцитами (Flores-Silva et al., 2015). В последнем случае остеобласты окружаются минерализованным матриксом и претерпевают морфологические изменения, в результате которых приобретают звездчатую форму. Эти клетки образуют сеть и участвуют в передаче сигналов через костную ткань (Rutkovskiy et al., 2016).

Клеточные механизмы и сигнальные каскады, лежащие в основе дифференцировки предшественников остеобластов во взрослой кости, до сих пор недостаточно изучены. Изучение ранних механизмов дифференцировки остеобластов, выделенных из костей взрослых людей, важно для понимания молеку-

лярных механизмов индукции остеогенной дифференцировки в зрелой кости.

Мы провели анализ ранних стадий остеогенной дифференцировки остеобластов, выделенных из кости взрослого человека, при помощи протеомики дробовика. Для этого мы выделили первичные культуры остеобластов из фрагментов бедренной кости трех доноров. Затем мы индуцировали остеогенную дифференцировку по стандартному протоколу остеогенной дифференцировки *in vitro*, выделили белки на 5-е сут остеогенной дифференцировки и провели протеомный анализ. Чтобы сделать наши данные более сопоставимыми с протеомами цельных костей, мы использовали кислотную экстракцию белков, аналогичную методам, используемым для минерализованных тканей. В результате мы описали физиологический сдвиг, связанный с дальнейшей дифференцировкой остеобластов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. Остеобластоподобные клетки выделяли из фрагментов эпифизов костной губчатой ткани бедренной кости, полученных во время операции в Национальном медицинском исследовательском центре травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена. От каждого участника, включенного в исследование, было получено информированное письменное согласие.

Выделение остеобластоподобных клеток из костной ткани осуществляли ферментативным методом. Костную ткань промывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ), содержащем 1% раствора пенициллина-стрептомицина. Эксплантат измельчали на фрагменты размером до 0.5 мм с помощью твердосплавных фрез. Фрагменты соединительной ткани удаляли, губчатую кость многократно промывали в ФСБ и использовали для дальнейшего выделения. Фрагменты губчатой кости инкубировали в 0.2%-ном растворе коллагеназы II типа (Worthington Biochemical Corporation, США) в течение 30 мин при 37°C. Гомогенизированную массу промывали в ФСБ, переносили в 0.2%-ный раствор коллагеназы IV типа (Worthington Biochemical Corporation, США) и инкубировали 16 ч при 37°C. После инкубации коллагеназу IV типа инактивировали высокоглюкозной (4.5 г/л глюкозы) питательной средой DMEM (Gibco, США), содержащей 15% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, HyClone, США), 2 mM L-глутамина и 0.1% раствора аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США). Эта же среда в дальнейшем использовалась для культивирования клеток. Полученную суспензию переносили в культуральный флакон и культивировали в течение нескольких недель в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Для дальнейших экспериментов использовали клетки после трех-четырех пассажей. Клетки высевали с плотностью 22 × 10³ на 1 см².

Для индукции остеогенной дифференцировки использовали классическую остеогенную среду, универсальную для клеток многих типов (Lobov, Malashicheva, 2022): DMEM, содержащую 10% ФБС, 2 mM L-глутамина, 100 Ед./мл пенициллина/стрептомицина, 50 мг/мл аскорбиновой кислоты, 0.1 mM дексаметазона (Sigma-Aldrich, США) и 10 mM β -глицерофосфата натрия (Sigma-Aldrich, США). На пятые сутки дифференцировки клетки снимали трипсином, центрифугировали (1500 g, 5 мин), промывали ФБС и центрифугировали. Полученный сухой осадок замораживали при -80°C . Отложение кальция выявляли с помощью окраски ализариновым красным (Sigma, США) на 14-й день дифференцировки.

Экстракция белка. Для экстракции белка использовали остеобласты от трех доноров в двух состояниях (контрольном (без дифференцировки) и на 5-е сут остеогенной дифференцировки). К осадку клеток добавляли 100 мкл 0.2 N HCl и инкубировали в течение 30 мин при 4°C . Затем образцы центрифугировали (16000 g, 10 мин, 4°C), супернатант переносили в новую пробирку и белок осаждали 4 объемами ледяного ацетона (LC-MS Grade; LiChrosolv, Германия) в течение ночи при -20°C . Белковый осадок сушили на воздухе и ресуспендировали в 8 M мочевины (Sigma Aldrich, США) в 50 mM бикарбонате аммония (Sigma Aldrich, США).

Трипсинолиз. Концентрацию белка измеряли с помощью флуориметра Qubit (Thermo Fisher Sci, США) с помощью набора Qubit Protein Quantification Kit (Lumiprobe, Россия). Использовали по 20 мкг каждого образца. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 5 mM ДТТ (Sigma Aldrich, США) с последующей инкубацией в 15 mM йодацетамиде в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре (Sigma Aldrich, США) с последующим гашением йодацетамида дополнительным количеством 5 mM ДТТ. Затем образцы разбавляли семью объемами 50 mM бикарбоната аммония и инкубировали в течение 16 ч при 37°C с трипсином в соотношении 1 : 50 (Promega, США).

Образцы выпаривали в центрифужном концентраторе Labconco Centrivar (Labconco, США) и растворяли в воде (LC-MS Grade; LiChrosolv, Германия), содержащей 0.1% муравьиной кислотой (Sigma Aldrich, США). Триптические пептиды обессоливали методом твердофазной экстракции с использованием наконечников с 18 Zip-Tip (Merck, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Обессоленные пептиды упаривали в центрифужном концентраторе Labconco Centrivar (Labconco, США) и растворяли в воде с 0.1% муравьиной кислоты для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС-анализа.

ВЭЖХ-МС-МС-анализ. Приблизительно 600 нг пептидов использовали для анализа протеомики дробовика методом ВЭЖХ-МС-МС с ионной подвижностью в масс-спектрометре TimsToF Pro (Bruker Dalton-

ics, Германия) с УВЭЖХ-хроматографом nanoElute (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). УВЭЖХ проводили в режиме двухколоночного разделения с использованием трэп-колонок AcclaimTM Pep-MapTM 5 мм (Thermo Fisher Scientific, США) и разделительной колонки Bruker Fifteen (C18 ReproSil AQ, 150 мм $\times$ 0.75 мм, 1.9 мкм, 120 Å; Bruker Daltonics, Германия) в градиентном режиме со скоростью потока 400 нл/мин при температуре колонки 40°C . Фаза А представляла собой 0.1%-ный водный раствор муравьиной кислоты, фаза В – 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (LC-MS Grade; LiChrosolv, Германия). Градиент составлял от 2 до 30% фазы В в течение 42 мин, затем до 95% фазы В в течение 6 мин с последующей промывкой 95%-ной фазы В в течение 6 мин. Колонку уравнивали 4 объемами колонки перед каждым образцом. Для ионизации электро-распылением использовали ионный источник CaptiveSpray (Bruker, Германия) с капиллярным напряжением 1600 В, потоком азота 3 л/мин и температурой источника 180°C . Масс-спектрометрию проводили в автоматическом режиме DDA PASEF с циклом 0.5 с в положительной полярности с фрагментацией ионов с не менее чем двумя зарядами в диапазоне m/z от 100 до 1700 и диапазоне ионной подвижности от 0.85 до 1.30 1/K0.

Протеомные данные масс-спектрометрии доступны в базе данных ProteomeXchange через партнерский репозиторий PRIDE (Perez-Riverol et al., 2022) с идентификаторами набора данных PXD033697 и 10.6019/PXD033697.

Анализ протеомных данных. Идентификацию белков проводили в программном обеспечении Peaks Xpro (Bioinformatics Solutions Inc., Канада) по базе данных белков человека SwissProt (<https://www.uniprot.org/>; по состоянию на 28 марта 2021 г.; загружено 2 марта 2021 г.; 20394 последовательностей) с допустимой ошибкой исходной массы 10 ppm и допустимой ошибкой массы фрагмента 0.05 ppm, частотой ложного обнаружения (FDR) белков и пептидов менее 1% и двумя возможными пропущенными сайтами трипсинолиза. За фиксированную модификацию принимали карбамидометилирование цистеина. В качестве переменных модификаций задавали окисление метионина, ацетилирование N-конца белка, дезамидирование аспарагина и глутамина.

Площади пиков (Area under the curve) были использованы для анализа данных в R (версия 4.1.2; графический интерфейс 1.77, сборка High Sierra; 2021 г.). В первую очередь был проведен качественный анализ. Для каждой группы (недифференцированные (контрольные) и дифференцированные остеобласты) отбирали белки, которые обнаруживались не менее чем в двух из трех образцов, и количество уникальных белков для контрольных или дифференцированных остеобластов сравнивали с помощью диаграммы Венна из пакета "ggvenn" (Yan, 2021).

Для количественного анализа использовали белки, обнаруженные более чем в 4 образцах. Отсутствующие значения были заполнены методом ближайших соседей из пакета “impute” (Hastie et al., 2022). Затем мы произвели логарифмическое преобразование и квантильную нормализацию данных с дальнейшим анализом дифференциальной экспрессии с помощью пакета “limma” (Ritchie et al., 2015). Мы также выполнили ординацию образцов с помощью метода главных компонент (PCA) и разреженного дискриминантного анализа на основе частных наименьших квадратов (sPLS-DA) из пакета “MixOmics” (Rohart et al., 2017). Мы использовали пакеты ggplot2 (Wickham, 2016) и EnhancedVolcano (Blighe et al., 2022) для визуализации данных. На диаграмме рассеивания мы представили дифференциально экспрессируемые белки между контрольными и дифференцированными остеобластами. На кратном изменении Log2 мы показываем уровень изменения экспрессии, на Log10P — логарифм скорректированного P-значения. Пунктирные линии отделяют данные со скорректированным значением $P < 0.05$ и кратным изменением Log2 $> |1|$. Функциональная аннотация белков была выполнена по Базе данных для аннотации, визуализации и комплексного обнаружения (DAVID; версия 6.8) (<https://david.ncifcrf.gov/>, по состоянию на 17 апреля 2022 г.).

Иммуноцитохимия. Для иммуноцитохимической окраски клетки выращивали на покровных стеклах в стандартных условиях культивирования. Затем клетки промывали PBS и фиксировали 10 мин в 4%-ном параформальдегиде, трижды промывали PBS и пермеабелизовали в 0.1%-ном Тритоне X-100 (на PBS) в течение 10 мин с последующим блокированием в 1%-ном БСА (PBS) в течение 30 мин. Затем клетки инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами к BMP-2/4 (sc-9003, Santa Cruz, США), RUNX2 (ab76956; Abcam, США), остеокальцину (ab93876; Abcam, США) и остеопонтину (sc-21742; Санта-Круз, США). Клетки трижды промывали PBS и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa488 (Invitrogen, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации ядер использовали краситель DAPI. Микрофотографии были получены с помощью микроскопа AxioObserver Microscope (Zeiss, Германия) с программным обеспечением AxioVision (Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Остеобласты положительны на поздние маркеры остеогенной дифференцировки, но все еще не способны к минерализации внеклеточного матрикса. Сначала мы проводили иммуноцитохимическую окраску основных маркеров более поздних стадий остеогенной дифференцировки (BMP-2/4, остеокальцин, остеопонтин, RUNX2) и оценивали уровень минерализации ВКМ окрашиванием ализариновым красным в

стандартных условиях культивирования и после индукции остеогенной дифференцировки. Остеобласты были положительными по всем анализируемым маркерам (рис. 1а). Тем не менее, в стандартных условиях культивирования на среде DMEM мы не выявили минерализации ВКМ: образцы обоих доноров не окрашивались ализарином (рис. 1б, лунки слева). Добавление остеогенных индукторов индуцировало дифференцировку в обоих образцах, подтверждая, что клетки способны к остеогенной дифференцировке (рис. 1б, лунки справа).

Остеобластам требуется минимальный физиологический сдвиг, чтобы начать минерализацию внеклеточного матрикса. Протеомный анализ методом дробовика выявил 2207 белковых групп, которые были идентифицированы как минимум по двум пептидам с величиной FDR $< 1\%$. Мы начали с качественного анализа. Для каждой группы (контрольной или дифференцированной) отбирали белки, которые обнаруживались не менее чем в двух из трех образцов. Только 1785 таких белков были общими для всех образцов, в то время как 142 белка были уникальными для контрольных (недифференцированных) остеобластов и 111 — для дифференцированных (рис. 2в). Список уникальных идентификаторов белков, специфичных для контрольных и дифференцированных остеобластов, приведен в дополненных материалах (см. Приложение 1).

Анализ обогащения по базе данных Gene Ontology показал, что белки, уникальные для контрольных (недифференцированных) остеобластов (142 белка), связаны со многими биологическими процессами, среди которых организация внеклеточного матрикса ($P = 3.6 \times 10^{-2}$), ангиогенез ($P = 3.0 \times 10^{-2}$), клеточный цикл ($P = 4.0 \times 10^{-2}$), ремоделирование хроматина ($P = 11.8 \times 10^{-3}$) и сплайсинг мРНК ($P = 2.2 \times 10^{-3}$).

Белки, специфичные для дифференцированных остеобластов, были вовлечены в такие процессы, как регуляция трансляции ($p = 3.7 \times 10^{-3}$), метаболизм пирувата ($P = 2.4 \times 10^{-4}$) и углерода ($P = 5.3 \times 10^{-2}$), организация внеклеточного матрикса ($P = 1.7 \times 10^{-3}$), включая организацию коллагеновых фибрилл ($P = 3.1 \times 10^{-4}$) и актиновых микрофиламентов ($P = 7.5 \times 10^{-3}$), а также адгезию ($P = 2.7 \times 10^{-2}$), межклеточные контакты ($P = 4.9 \times 10^{-2}$) и ангиогенез ($P = 2.6 \times 10^{-3}$).

Затем мы провели количественный анализ, который включал 1612 белков. На основе этого набора данных мы выполнили кластеризацию наших образцов с помощью метода PCA и разреженного дискриминантного анализа sPLS-DA (рис. 2а). Оба метода выявили два кластера, поэтому остеобласты имели разные протеомные профили до и во время дифференцировки остеобластов, несмотря на раннюю временную точку дифференцировки, которую использовали для анализа (рис. 2а). Кроме того, мы провели анализ дифференциальной экспрессии и обнаружили

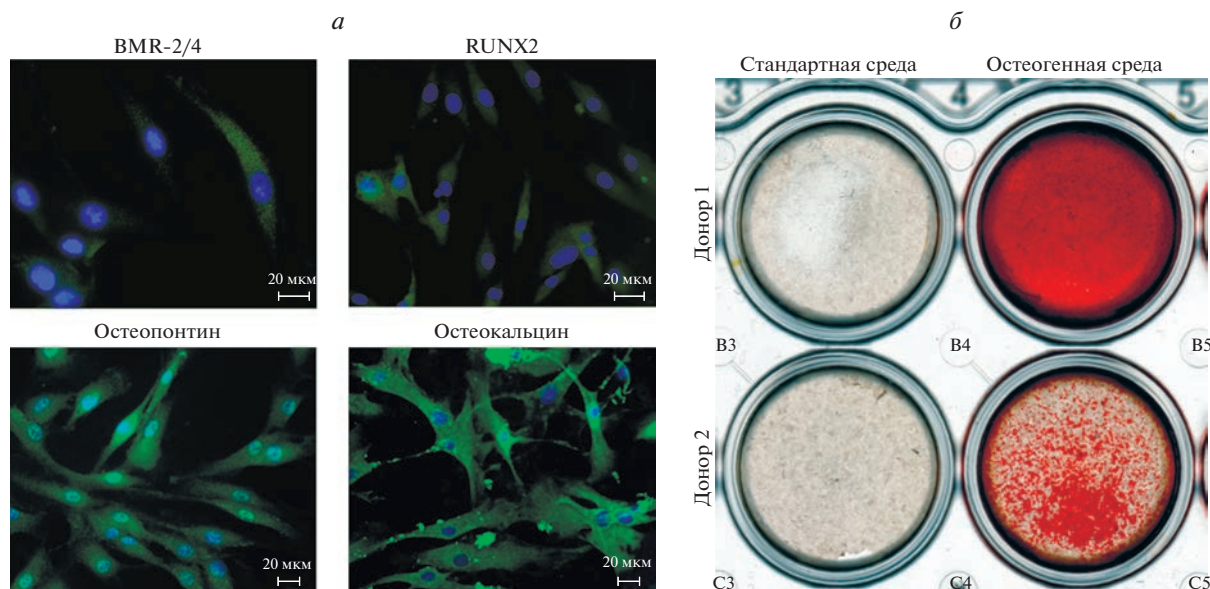


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание остеобластов антителами к остеогенным маркерам (а) и окрашивание ализариновым красным контрольных и дифференцированных остеобластов от двух доноров (б).

только девять дифференциально экспрессируемых белков со скорректированным значением P менее 0.05 (рис. 2б). Семь из этих белков активировались, а два подавлялись в ходе дифференцировки.

Анализ обогащения по базе данных Gene Ontology показал, что белки, активируемые при остеогенной дифференцировке, участвуют в связывании рибосом ($P = 2.0 \times 10^{-4}$), биогенезе клеточных мембран ($P = 2.8 \times 10^{-4}$), негативной регуляции центральных сигнальных путей ($P = 1.0 \times 10^{-3}$), связывании углеводов ($P = 1.6 \times 10^{-3}$), адгезии и миграции клеток. Выявленные белки с пониженной регуляцией связаны с организацией коллагеновых фибрилл и восстановлением тканей.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы сравнили протеомы остеобластов, выделенных из костей взрослых, при стандартном культивировании *in vitro* и на ранней стадии остеогенной дифференцировки (5-е сут).

Мы выявили неожиданно небольшие протеомные различия между контрольными и дифференцированными остеобластами и только девять статистически значимых дифференциально экспрессирующихся белков между ними. Это можно объяснить тем, что остеобласты уже дифференцированы и имеют высокий уровень экспрессии специфичных белков костного внеклеточного матрикса и RUNX2 — главного регулятора остеогенной дифференцировки (рис. 1а). Анализ обогащения белков, идентифицированных в остеобластах, выявил 29 белков, связанных с термином “дифференциация остеобластов”. Следовательно, большинство белков, необходимых

для минерализации ВКМ, уже присутствуют в остеобластах. Мы не можем сделать вывод, являются ли анализируемые клетки зрелыми остеобластами или их предшественниками. Тем не менее, остеобласты способны осуществлять минерализацию ВКМ только в остеогенной среде, и для их перехода от пролиферации к минерализации матрикса необходимы некоторые физиологические изменения (рис. 1б). В случае такого незначительного сдвига протеома изменения могут быть связаны не с экспрессией белков, а с их посттрансляционными модификациями, локализацией, белок-белковыми взаимодействиями и многими другими факторами, влияющими на биологические функции белков, но упущенными в наших данных протеомики дробовика.

Другим фактором, снижающим количество идентифицируемых белков, является используемый метод кислой экстракции белков. Известно, что кость плохо поддается протеомному анализу, поскольку она минерализована. Поэтому большинство протоколов экстракции белка основаны на деминерализации кости с последующей солиubilизацией белка (Cleland et al., 2012 ; Cleland, Vashishth, 2015). Деминерализация является важным этапом экстракции костного белка, который значительно увеличивает выход белка (Jiang et al., 2007; Cleland, Vashishth, 2015). Таким образом, экстракция белка в кислой среде является часто используемым методом (Jiang et al., 2007). Однако большинство исследований протеомики костей основано на системах *in vitro*, таких как культивируемые остеобласты и остеокласты. Как правило, для выделения белков из культивируемых остеобластов используются стандартные методы экстракции, подходящие для мягких тканей. Также

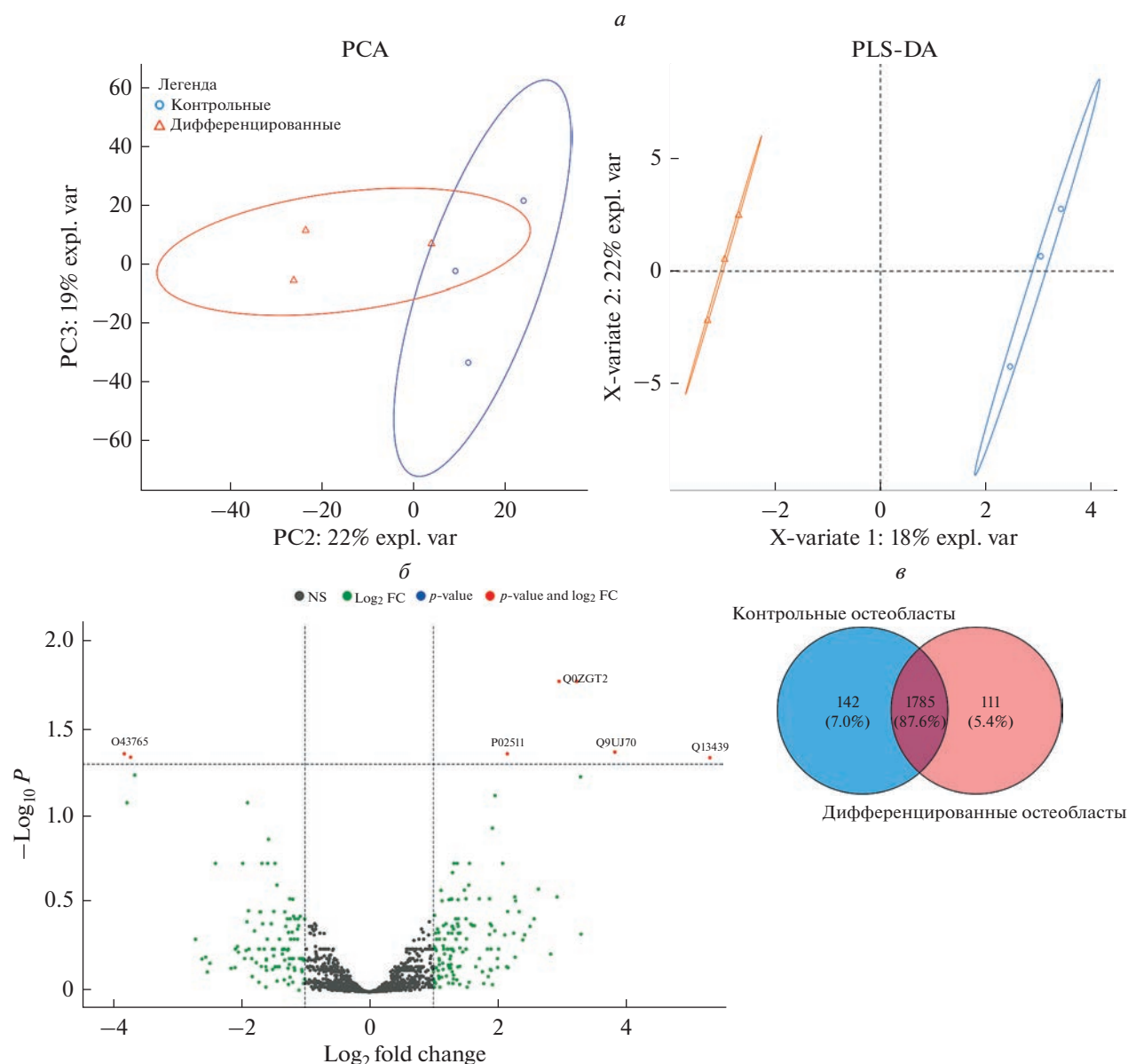


Рис. 2. Сравнение протеомных профилей остеобластов человека в контроле и на пятые сутки остеогенной дифференцировки. *a* – Метод главных компонент (PCA) и разреженный дискриминантный анализ на основе частных наименьших квадратов (sPLS-DA), представляющие кластеризацию протеомов контрольных и дифференцированных остеобластов. *б* – Диаграмма рассеивания, демонстрирующая дифференциально экспрессируемые белки между контрольными и дифференцированными остеобластами; Log₂ fold change – уровень изменения экспрессии, $-\text{Log}_{10}P$ – логарифм скорректированного значения P . Пунктирные линии отсекают данные со скорректированным значением $P < 0.05$ и кратным изменением $\text{Log}_2 > |1|$. *в* – Диаграмма Венна показывает количество уникальных белков для контрольных или дифференцированных остеобластов.

отмечается, что разные методы экстракции позволяют выделять разные типы белков (Jiang et al., 2007). Подобно методам, используемым для цельной кости, мы использовали кислотную экстракцию, но в нашем случае это приводит к более низкому охвату протеома по сравнению с нашим исследованием протеомики дробовика с методами экстракции белка, специализированными для клеточных культур (данные не показаны).

Тем не менее, мы обнаружили, что протеомы контрольных и дифференцированных остеобластов образуют отдельные кластеры как на графиках PCA, так и на графиках sPLS-DA. Эти данные подтверждают физиологический сдвиг и дальнейшую дифференцировку остеобластов, индуцированную остеогенной средой. В соответствии с этим минерализация ВКМ выявлялась только в дифференцированных остеобластах.

Мы идентифицировали только девять дифференциально экспрессируемых белков. Семь из них активируются: нексилин (регулирует миграцию клеток посредством ассоциации с актиновым цитоскелетом), NОMО1-3 (противодействует передаче сигналов Nodal), N-ацетил-D-глюкозаминкиназа, альфа-кристаллин В-цепи (малый белок теплового шока), GOLGA4 (участвует в везикулярном транспорте) и два белка с подавленной регуляцией (белок альфа, содержащий малый богатый глутамином тетраатрикопептидный повтор (ко-шаперон), и люмикан — малый протеогликан с повтором, богатым лейцином).

В то время как известно, что люмикан является важным компонентом ВКМ кости (Raouf et al., 2002), сигнальный путь Nodal ранее не был описан при дифференцировке остеобластов. Мы предполагаем, что эти белки связаны с усилением образования кристаллов гидроксиапатита, но их молекулярные функции требуют изучения в будущем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы охарактеризовали ранние стадии остеогенной дифференцировки остеобластов, выделенных из фрагментов бедренной кости взрослых людей, с помощью протеомики дробовика при кислотной экстракции белка. Мы обнаружили, что, несмотря на способность к пролиферации *in vitro*, эти клетки имеют сходный с остеобластами протеом на 5-е сут остеогенной дифференцировки, но мы обнаружили некоторый физиологический сдвиг, который может быть необходим для перехода от пролиферации к минерализации матрикса. Эти изменения в дифференцированных остеобластах связаны со снижением пролиферативной активности клеток и их участием в организации внеклеточного матрикса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Протеомику дробовика выполнили в Ресурсном центре “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-14-00152).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и (или) национального комитета по этике исследований, а также Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым этическим стандартам. От каждого участника, включенного в исследование, было получено информированное письменное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А.Л.: Концептуализация; И.А.Х., А.А.Л., А.Б.М.: методология; программное обеспечение; И.А.Х., А.А.Л., И.А.Х.: формальный анализ; И.А.Х., Д.А.К., Б.Р.З., Е.С.Г., Р.М.Т., С.А.Б., А.П.С., В.В.К.: средства; А.А.Л., А.Б.М.: проведение исследования; И.А.Х., Д.С.К.: курирование данных; И.А.Х.: написание статьи; А.А.Л. и А.Б.М.: редактирование; Е.С.Г., И.А.Х.: визуализация данных; А.А.Л., А.Б.М.: общее руководство. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Приложение 1 — результаты анализа дифференциальной экспрессии белка между контрольными и дифференцированными остеобластами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bahney C., Zondervan R., Allison P., Theologis A., Ashley J., Ahn J., Miclau T., Marcucio R., Hankenson K. 2019. Cellular biology of fracture healing. *J. Orthop. Res.* V. 37. P. 35. <https://doi.org/10.1002/jor.24170>
- Blighe K., Sharmila R., Myles L. 2022. EnhancedVcano: publication-ready Vcano plots with enhanced colouring and labeling. <https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/EnhancedVcano/inst/doc/EnhancedVcano.html>
- Bragdon B., Bahney C. 2018. Origin of reparative stem cells in fracture healing, *Curr. Osteoporos. Rep.* V. 16. P. 490. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0458-4>
- Cleland T., Vashishth D. 2015. Bone protein extraction without demineralization utilizing principles from hydroxyapatite chromatography. *Anal. Biochem.* V. 472. P. 62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.006>
- Cleland T., Voegele K., Schweitzer M. 2012. Empirical evaluation of bone extraction protocols. *PLoS One.* V. 7. P. e31443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031443>
- Florencio-Silva R., Sasso G., Sasso-Cerri E., Simões M., Cerri P. 2015. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed. Res. Int.* V. 2015. P. e421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Hastie T., Tibshirani R., Narasimhan B., Chu G. 2022. Impute: imputation for microarray data. *Bioconductor version: Release (3.14)*. <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/impute.html>
- Jiang X., Ye M., Jiang X., Liu G., Feng S., Cui L., Zou H. 2007. Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *J. Proteome Res.* V. 6. P. 2287. <https://doi.org/10.1021/pr070056t>
- Lobov A., Malashicheva A. 2022. Osteogenic differentiation: a universal cell program of heterogeneous mesenchymal cells or a similar extracellular matrix mineralizing phenotype? *Bio. Comm.* V. 67. P. 32. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2022.104>

- Matthews B., Novak S., Sbrana F., Funnell J., Cao Y., Buckels E., Grcevic D., Kalajzic I. 2021. Heterogeneity of murine periosteum progenitors inVved in fracture healing. *Elife*. V. 10. P. e58534. <https://doi.org/10.7554/eLife.58534>
- Perez-Riverol Y., Bai J., Bandla C., García-Seisdedos D., Hewapathirana S., Kamatchinathan S., Kundu D.J., Prakash A., Frericks-Zipper A., Eisenacher M., Walzer M., Wang S., Brazma A., Vizcaino J.A. 2022. The PRIDE database resources in 2022: A hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res.* V. 50. D543–D552. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1038>
- Pitkänen S. 2020. In vitro and in vivo osteogenesis and vasculogenesis in synthetic bone grafts. Doctoral dissertation: Tampere University.
- Raouf A., Ganss B., McMahon C., Vary C., Roughley P., Seth A. 2002. Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biol.* V. 21. P 361. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(02\)00027-6](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(02)00027-6)
- Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* V. 43. P. e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rohart F., Gautier B., Singh A., Cao K. 2017. mixOmics: an R package for ‘omics’ feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* V. 13. P. e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Rutkovskiy A., Stensløkken K., Vaage I. 2016. Osteoblast differentiation at a glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* V. 22. P. 95. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142>
- Wickham H. 2016. ggplot2. Cham: Springer Int. Publishing.
- Yan L. 2021. ggvenn: Draw Venn Diagram by “ggplot2”. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggvenn/>

Osteogenic Differentiation *in vitro* off Human Osteoblasts is Associated with Only Slight Shift in Their Proteomics Profile

I. A. Khvorova^a, D. A. Kostina^a, B. R. Zainullina^b, E. A. Fefilova^a, E. S. Gromova^a, R. M. Tikhilov^c, S. A. Bozhkova^c, A. P. Sereda^c, V. V. Karelkin^c, A. B. Malashicheva^a, and A. A. Lobov^{a,*}

^aLaboratory of Regenerative Biology, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

^bResource Centre for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^cVreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, 195427 Russia

*e-mail: lobov@incras.ru

Fracture healing is a complex process in which the periosteum and endosteum become the main sources of osteoblast progenitor cells. However, cellular mechanisms and signaling cascades underlying the early stages of osteoblast progenitors differentiation in adult bone are still not well understood. Therefore, we performed shotgun proteomics analysis of primary culture of isolated human osteoblasts from femur of adult donors in undifferentiated conditions and on the sixth day of osteogenic differentiation *in vitro*. This is an early timepoint in which we have observed no extracellular matrix mineralization yet. 1612 proteins identified with at least two unique peptides were included in proteomics analysis. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD033697. Despite the fact, that matrix mineralization starts only after induction of osteogenic differentiation, we revealed unexpectedly weak physiological shift associated with a decrease of cells proliferative activity and changes in proteins inVved in extracellular matrix secretion and organization. We demonstrated that osteoblasts were positive for markers of later osteogenic differentiation stages during standard cultivation: osteopontin, osteocalcin, BMP-2/4 and RUNX2. Therefore, further differentiation required for matrix mineralization needs minimal physiological changes.

Keywords: osteoblasts, osteogenic differentiation, shotgun proteomics, bone, mass spectrometry