

УДК 57.085

## СТРУКТУРА И МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СОЕДИНИТЕЛЬНОВУСНЫХ ОБОЛОЧЕК ПАРАВЕРТЕБРАЛЬНЫХ СУХОЖИЛИЙ

© 2024 г. А. А. Гайдаш<sup>1,\*</sup>, А. И. Кулак<sup>1</sup>, В. К. Крутько<sup>1,\*\*</sup>, М. И. Блинова<sup>2</sup>,  
О. Н. Мусская<sup>1</sup>, С. А. Александрова<sup>2</sup>, К. В. Скроцкая<sup>3</sup>, В. А. Кульчицкий<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем  
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

<sup>4</sup>Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

\*e-mail: algaidashspb@gmail.com, tsuber@igic.bas-net.by\*\*

Поступила в редакцию 16.02.2024 г.

После доработки 04.03.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Изучены морфогенетические свойства коллагенового геля, полученного ацетатной экстракцией из соединительнотканых оболочек (перитенонов) паравертебральных сухожилий крыс Вистар. Гель использовали в качестве подложки при культивировании *in vitro* совместно с мезенхимальными стромальными клетками в течение 14 сут в ростовой и остеогенной инкубационных средах. Установлено, что коллагеновый каркас перитеноновой подложки приобретает прочность за счет увеличения связности фибриллярных узлов и структурирован с формированием пластинчатых и клубковых образований. Сесамовидные глобулы, проникающие в подложку из исходного перитенонового геля, инертны в ходе культивирования в ростовой среде, а в остеогенной – проявляют повышенную способность к структурированию кальцийфосфатов. Формирование клеточно-опосредованных структур происходит по направлениям фибро-, тендо-, лигаменто- и остеогенной дифференцировки. Фиброгенное направление обеспечивает коллагеновым материалам структурирующийся каркас; теногенное – формирование сухожилий эмбрионального типа по механизму латеральной сборки коллагеновых субфибрилл на поверхностях клеток и их автономизацию в виде зачатков сухожильных нитей; лигаментогенное – структурирование коллагеновых лент, ассоциированных с клубками и эластическими волокнами; остеогенное – образование ламеллярных, трабекулоподобных и узелковых остеонидных структур путем внутримембранозной оссификации, сопровождающейся активацией щелочной фосфатазы и минерализации. Формирование предикторов энтез – организация комиссур между механически разнофазными компонентами остеонидных структур и каркаса. Разработана классификация таксономических форм и предложена гипотеза о роли эволюционных инструментов в структурировании коллагенового каркаса в тканевых культурах *in vitro*.

**Ключевые слова:** перитенон, сканирующая электронная микроскопия, фибриллярный коллаген, коллагеновый гель, структурирование коллагенового каркаса, гистогенез, кальцийфосфаты, классификация, микроэволюция

**DOI:** 10.31857/S0042132424030024, **EDN:** PSCJEW

### ВВЕДЕНИЕ

Сухожильную ткань широко используют в качестве сырьевого источника для получения различных коллагенсодержащих материалов (подложки, гели, скаффолды). Наиболее распространено применение ахилловых, надколенных

и хвостовых сухожилий лабораторных крыс, лошадей, овец. Во всех технологических процессах используют в основном свободные сухожильные нити, а их соединительнотканые капсулы (перитеноны), как правило, не применяют. Вместе с тем перитеноны относят к биологически ак-

тивному сырью, из которого возможно получить, например, прогениторные клетки (Mienaltowski, 2014). Перитенон по определению медицинского словаря Мерриам—Уэбстер — это соединительнотканная оболочка сухожилия (<https://www.merriam-webster.com/medical/peritenon>). Оболочка представляет собой капсулу, образованную рыхлой волокнистой соединительной тканью, внутри которой расположены сухожильные нити второго—третьего уровней анатомической организации. В филогенезе и, соответственно, в эмбриогенезе возникают специализированные области с однонаправленной ориентацией коллагеновых массивов — линейные сухожилия, в ходе эволюции соединяющиеся с прилегающей формирующейся костной тканью. Массивы коллагеновых волокон в пограничных участках и, прежде всего, в областях остеотендинозных и остеолигаментозных соединений формируют перитеноны (Summers, Koob, 2002). В структурно-механическом и функциональном отношении — это области повышенного механического напряжения, что увеличивает риски износа и требует специальной защиты. В связи с этим в эти области мигрируют транскрипционные метаболиты (SOX-9 и склераксис), контролирующие хондрогенез и теногенез, трансформирующий фактор роста (TGF)- $\beta$ , инсулиноподобный фактор роста-1, основной фактор роста фибробластов (bFGF) и тромбоцитарный фактор роста, участвующие в процессах репаративной регенерации сухожилий (Blitz et al., 2009; Rossetti et al., 2017). Механобиологический тренд поддерживает и формирование так называемых энтезисных органов с их размещением в областях, компенсирующих механическое напряжение, на границах раздела между структурами с различными механическими свойствами, что благодаря особой конструкции межфазных прикреплений в костно-сухожильных соединениях обеспечивает распределение нагрузки (Benjamin, Ralphs, 2001). Синхронно с энтезами возникает и сесамовидная ткань, гистогенетически представляющая собой продукт деятельности теноцитов и размещенная в перитенонах, нередко вблизи мягкой части энтез (Benjamin et al., 2002). К структурным компонентам сесамовидной ткани относят островки и глобулы. Островки часто локализованы в мягкой части энтез. Сесамовидные глобулы — подвижные частицы, цитогенетическими предшественниками которых служат матриксные везикулы, синтезируемые теноцитами. Матриксные везикулы и сесамовидные глобулы — ключевые акторы, упрочняющие ткань сухожилий посредством локальной минерализации

(Iwayama et al., 2022). В тканях перитенонов находят реализацию и физико-химические предпосылки к агрегации и компактизации фибриллярного коллагена с формированием пластинчатых структур в виде щелочного сдвига кислотности внеклеточного матрикса (Гайдаш и др., 2022).

Вышеприведенные обстоятельства позволяют рассматривать перитеноны как накопитель морфогенетических потенциалов. С учетом этого прогрессирует технологический интерес к перитенонам и возрастают сырьевые перспективы материала при проектировании различных матриц на основе фибриллярных коллагенов.

В соответствии с этим приобретает актуальность и задача разработки методологического инструментария для оценки морфогенетических свойств материала, включающая, в том числе, создание морфологической классификации надмолекулярных структур коллагенового каркаса, формирующихся в ходе культивирования в условиях *in vitro*.

Цель работы состояла в определении морфогенетических свойств и разработке классификации супрамолекулярных структур, формирующихся в условиях *in vitro* в коллагеновом каркасе подложки, полученной из перитенонового геля.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сухожилия формируют клетки нервного гребня эктодермы, параксиальной мезодермы и мезодермы латеральной пластинки. Осевые сухожилия происходят из одного из четырех отделов сомитов с обособлением в проксимально-дистальном направлении из дорсолатеральной полоски (Schweitzer et al., 2001). Это позволяет предположить, что в дорсальном листке перитенона проксимального отрезка сухожилия камбиальный потенциал выше, чем в вентральном листке дистальной части хвоста. В соответствии с этим и производили вырезку перитенонов. Вначале обнажали сухожильные пучки, размещенные в соединительнотканной оболочке проксимальной трети хвоста. Затем оболочку вскрывали, выводили свободные сухожильные нити, отсекали вентральный и отсепаровывали дорсальный листки перитенона по линии прикрепления к наружной пластинке надкостницы позвоночного столба. Именно из этого сырья получали перитеноновые гели и подложки.

Ацетатные экстракты коллагена готовили по методикам, обеспечивающим сохранение концевых телопептидов, что необходимо для эф-

фективного гелеобразования (Кухарева и др., 2003; Chandrakasan et al., 1976). Стоковый раствор получен разведением экстракта коллагена до конечной концентрации 2 мг/мл десятикратной средой 199 (Gibco, США), нейтрализован 0.34 М NaOH (х.ч., ООО “СГС Хим”). Перитеноновый гель готовили экспонированием стокового раствора в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в течение 30 мин.

Коллагеновую подложку получали, разливая перитеноновый гель, приготовленный непосредственно перед использованием в эксперименте *in vitro*, в чашки Петри, и оставляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C на 1 сутки. На отвердевшую перитеноновую подложку наливали питательные среды и высевали мезенхимальные стромальные клетки (МСК). Использовали мультипотентные МСК костного мозга новорожденного кролика породы Шиншилла. Культивирование осуществлено в питательной среде следующего состава: DMEM/F12 (Биолот, РФ), сыворотка эмбрионов коров (HyClone, США), раствор антибиотиков PenStrep (Sigma, США), раствор L-глутамина Ultraglutamine (Lonza, Belgium). Продолжительность культивирования без промежуточных переосевов составила 14 сут. Изучены образцы следующих групп: 1-я – перитеноновый гель *ex tempore*; 2-я – коллагеновая подложка с посеянными в ростовую питательную среду МСК; 3-я – коллагеновая подложка с МСК, посеянными в остеогенную питательную среду. Выборки: 1-я группа – пять покровных стекол с нанесенным гелем, 2-я – три культуральные чашки с биоматериалом, 3-я – пять культуральных чашек с биоматериалом. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) готовили следующие образцы. Перитеноновый гель *ex tempore* (мазки на покровных стеклах) фиксировали в парах 1.5%-го водного раствора глutarового альдегида (25%, Thermo Scientific Chemicals), отмывали в деионизованной воде и высушивали при 37°C в течение 1 ч. Коллагеновые подложки 2-й и 3-й групп вместе с клетками фиксировали в культуральных чашках 1.5%-ным водным раствором глutarового альдегида, отмывали в деионизованной воде, высушивали при 37°C в течение 1 ч и обезвоживали в водных растворах этанола восходящей концентрации. Приготовленные образцы напыляли золотом на вакуумной установке K550X (Emitech, Англия). Исследование выполнено на микроскопах LEO 420 (Carl Zeiss, Германия) и JSM-7001F (Jeol, Япония). Морфометрические исследования произведены по СЭМ-изображениям в редакторе Photoshop

с применением калиброванных по масштабным отрезкам линейки для определения размеров структур и тестовых полей. Удельную площадь поверхности (показатель  $S_v$ ) вычисляли по формуле:  $S_v = 2n/l$ , где  $n$  – число точек пересечения с тестовой линией;  $l$  – длина тестовой линии в микрометрах. Численную плотность структур – количество фибриллярных узлов, пор, профилей коллагеновых волокон на постоянной площади определяли с применением “правила несмещенного подсчета” (Gundersen et al., 1988). Щелочную фосфатазу (ЩФ) выявляли гистохимически реактивом BCIP-NBT (Sigma, США) по отложению диформаза (нерастворимого продукта реакций NBT и BCIP с солями кальция и свободной фосфорной кислотой) в МСК, фиксированных 10%-ным формалином, на стандартном культуральном пластике в условиях ростовой и остеогенной среды (Golub, Boesze-Battaglia, 2007). Морфологические проявления активности ЩФ изучали с помощью световой микроскопии (СМ) с применением инвертированного микроскопа Nikon Eclips TS100, снабженного цифровой фотокамерой. Активность ЩФ оценивали морфометрически с определением относительного объема маркерных отложений (Автандилов, 1990).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ СТРУКТУР

### *Структура коллагенового каркаса перитеноновой подложки*

Перитеноновая подложка, на которой осуществляли культивирование МСК, имеет структуру слоистого (3–5 слоев) каркаса, образованного расправленной сетью коллагеновых фибрилл. О расправленном состоянии каркаса свидетельствует существенное снижение показателя  $S_v$  (табл. 1), оно обусловлено уменьшением поверхностного натяжения инкубационной среды в связи с введением в ее состав сыворотки эмбрионов коров, содержащей липиды. В сравнении с гелем коллагеновые фибриллы в подложке утолщены, более шероховаты (что повышает сцепленность), поры крупнее, но их численная плотность значительно меньше (табл. 1, рис. 1а, б). Увеличение толщины коллагеновых волокон в сочетании с увеличением их численной плотности свидетельствует о росте массы фибриллярного материала, что, в свою очередь, обусловлено интенсивными процессами самосборки и синтезом МСК фибриллярных коллагенов *de novo*. Утолщенные волокна деформируют коллагеновую сеть подложки: возникают плот-

**Таблица 1.** Морфометрические показатели коллагенсодержащих материалов, полученных из соединительнотканых оболочек паравerteбральных сухожилий ( $M \pm m$ )

Показатель	Перитеноновый гель		Перитеноновая подложка	
	каркас	клубки	каркас	клубки
Диаметр клубковых структур ( $D$ ), мкм	—	$6.5 \pm 0.3$	—	$9.6 \pm 1.6^*$
Толщина коллагеновых волокон ( $L$ ), мкм	$0.112 \pm 0.01$	$0.211 \pm 0.01$	$0.234 \pm 0.01^*$	$0.576 \pm 0.01^*$
Удельная площадь поверхности коллагеновых фибрилл ( $S_v$ ), мкм <sup>2</sup> /мкм <sup>3</sup>	$1.71 \pm 0.1$	$6.15 \pm 0.3$	$0.16 \pm 0.01^{**}$	$12.5 \pm 0.8^{**}$
Шероховатость коллагеновых волокон ( $Ra$ ), мкм	$0.11 \pm 0.01$	$0.14 \pm 0.01$	$0.19 \pm 0.02^*$	$0.08 \pm 0.01^*$
Диаметр пор ( $D$ ), мкм	$0.120 \pm 0.01$	$0.131 \pm 0.01$	$0.896 \pm 0.01^*$	$0.262 \pm 0.01^*$
Численная плотность пор ( $n$ ), п/мкм <sup>2</sup>	$8.75 \pm 0.5$	$17.0 \pm 1.2$	$0.97 \pm 0.1^{**}$	$11.2 \pm 0.6^*$
Диаметр фибриллярных узлов ( $D$ ), мкм	$0.621 \pm 0.01$	$0.231 \pm 0.01$	$0.361 \pm 0.01^*$	$0.506 \pm 0.01^*$
Связность фибриллярных узлов ( $r$ )	$3.3 \pm 0.1$	$3.8 \pm 0.1$	$6.3 \pm 0.1^*$	$3.9 \pm 0.1$
Численная плотность фибриллярных узлов ( $n$ ), п/мкм <sup>2</sup>	$3.7 \pm 0.1$	$10.1 \pm 0.5$	$2.3 \pm 0.1^*$	$1.9 \pm 0.1$

Примечание: \* достоверно при  $p < 0.05$ ; \*\* достоверно при  $p < 0.01$  при сравнении структуры в подложке с аналогичной структурой в перитеноновом геле.

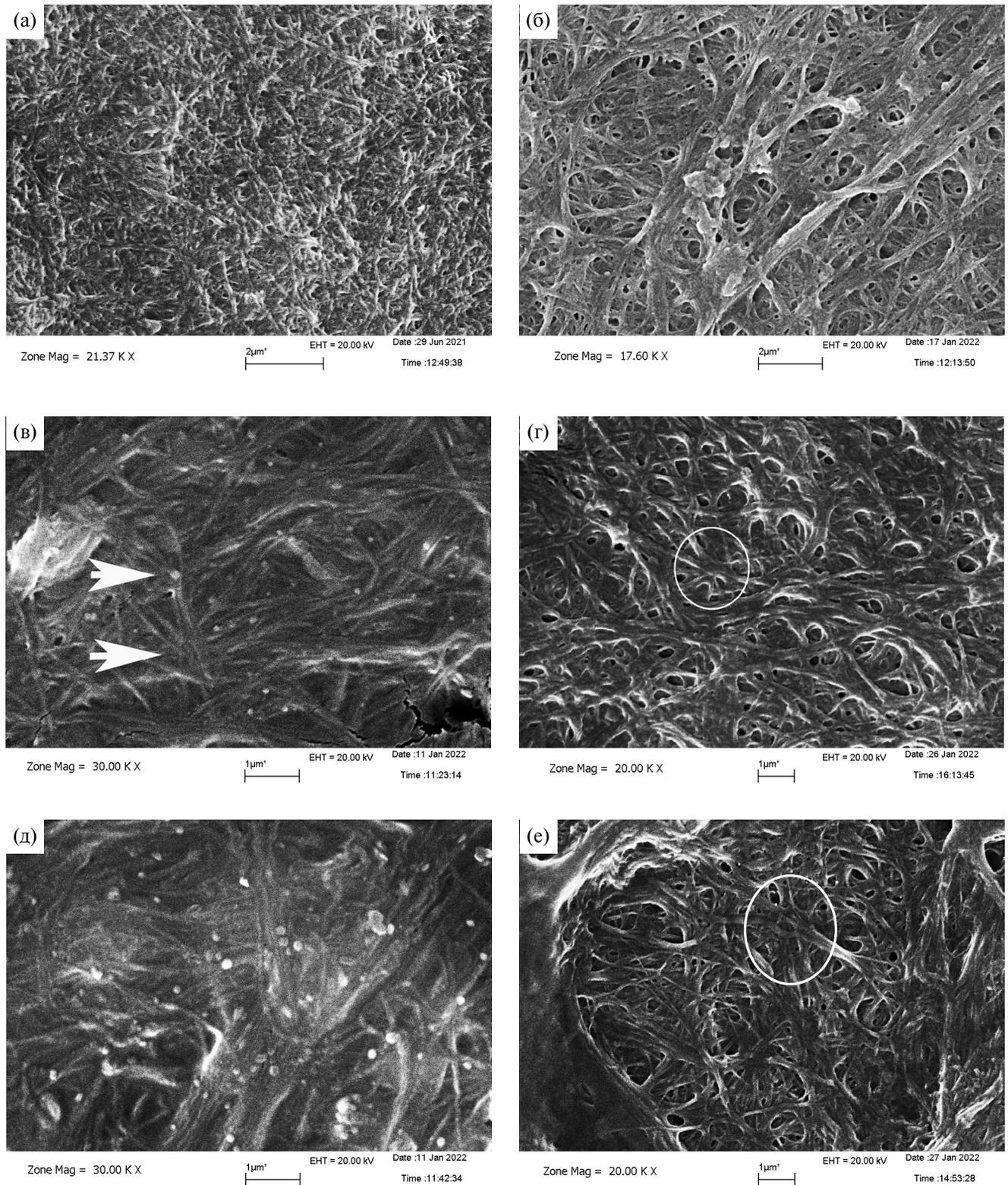
ные фиброзные тяжи с расширенным межфибрилярным пространством, что способствует турбулентности гидродинамических потоков в инкубационной среде. Фибриллярные узлы — структуры со сведенными под острыми углами к центру коллагеновыми фибриллами. В протоузлах тонкие фибриллы собраны в параллельные, но не слившиеся нити, которые ориентированы к центрам без надфибрилярных образований (рис. 1в). Разделенное состояние фибрилл повышает связность протоузлов до 8–9. В зрелых фибриллярных узлах коллагеновые фибриллы объединены вплоть до слияния и локальной гомогенизации, что, соответственно, понижает их связность (рис. 1г). В целом диаметр и численная плотность фибриллярных узлов в подложке меньше, чем в геле, но их связность выше (табл. 1). Гипотрофия и гипоплазия фибриллярных узлов неизбежно приводит к частичной потере прочности, которую в очагах завихрений каркаса (вследствие, например, повышенных механических нагрузок) в порядке опережающей компенсации может нивелировать осаждение кальцийфосфатов (рис. 1д). Однако прочность самоорганизующегося каркаса при культивировании в 2D-формате, по-видимому, не формирует морфогенетическую доминанту. Повышение механической чувствительности коллагеновой сети, ее быстрый, широкий и когерентный охват волнами механических ко-

лебаний, одним из источников и акцептором которого служат дифференцирующиеся клетки — морфогенетический мотив, реализация которого в структурирующемся каркасе термодинамически оптимальна. Соотношение пропорций протоузлов к зрелым формам при культивировании в ростовой питательной среде составляет 1 : 5, а при культивировании в остеогенной среде доля зрелых форм возрастает до 3 : 1. При этом узлы выглядят крупнее, нарастают их численная плотность и связность (табл. 1). Остеогенная среда, таким образом, ускоряет созревание фибриллярных узлов, структура которых приобретает большую упорядоченность (рис. 1е). В итоге коллагеновый каркас формирует жесткость и, соответственно, теряет эластичность.

К структурным компонентам подложки в сформированной классификации отнесены пластинчатые образования, клубковые структуры и сфероиды.

#### *Пластинчатые образования*

Формирование пластинчатых образований — частный случай надмолекулярного структурирования фибриллярного коллагена, осуществляемого как экстрацеллюлярно, так и внутри клеток. В соответствии с этим пластинчатые образования разделены на каркасные и клеточно-опосредованные. Каркасные пластинчатые обра-



**Рис. 1.** СЭМ-изображения структуры коллагеновой сети геля и каркаса подложки из перитенонового геля в ростовой и остеогенной средах: (а) структура исходного перитенонового геля; (б) деформация сети утолщенными коллагеновыми волокнами; (в) стрелки – зарождающиеся фибриллярные протоузлы; (г) эллипс – зрелый фибриллярный узел; (д) кальцийфосфаты в области формирующихся фибриллярных узлов; (е) эллипс – зрелый фибриллярный узел в перитеноновой подложке (остеогенная среда).

зования, анатомические компоненты подложки, представляют собой продукт экстрацеллюлярного структурирования фибриллярного коллагена различного происхождения (внутриклеточный синтез и занос в каркас из геля) и не обладают тканевой специфичностью. Клеточно-опосредованные пластинчатые образования анатомически связаны с МСК как исключительно внутриклеточные продукты синтеза и структурирования фибриллярного коллагена, они признаны гистогенетическими предикторами различной направленности.

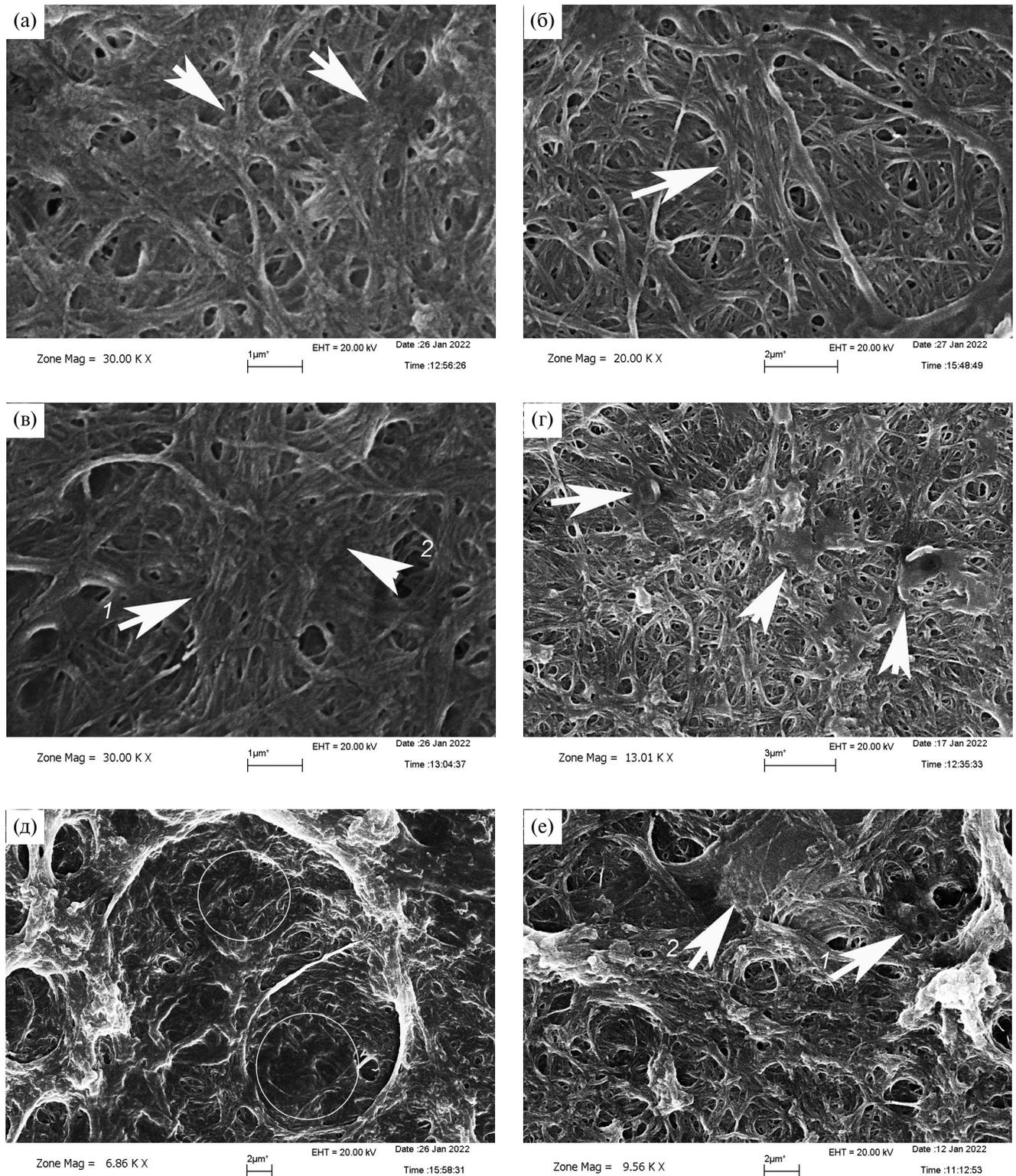
В коллагеновых подложках выявлено три разновидности каркасных пластинчатых образований: конвергированные пластинки, компакт-пластины и концентрические пластинки.

*Конвергированные пластинки* — сведенные “бок в бок” параллельно упакованные коллагеновые субфибриллы, встроенные в структуру каркаса (рис. 2а). Укладка волокон близка к параллельной. Это признают морфологическим критерием различия данной разновидности пластинчатых образований от фибриллярных узлов, в которых волокна направлены к центру и пересекают его под разными углами. Выявлены и их отличия от очагов простого сжатия коллагенового каркаса: конвергированные фибриллы выпрямлены и упорядочены, сжатые — извиты и хаотично переплетены. Блоки конвергированных пластинчатых образований не расслаивают подложку, залегают в один, в основном поверхностный слой. Длина блоков достигает 3–5 мкм, ширина варьирует от 0.75 до 2 мкм. В подложках, культивированных в остеогенной среде конвергированные пластинки крупнее за счет утолщенных коллагеновых фибрилл, некоторые из которых минерализованы (рис. 2б). Структура блоков неравномерная: участки сближения сменяют участки слияния. В участках компактного расположения соприкасающиеся волокна максимально сближены, но контуры фибрилл четкие, межволоконный матрикс рыхлый. В участках слияния контуры фибрилл размыты, вещество интерстиция гомогенизировано (рис. 2в). Полиморфизм блоков свидетельствует о метастабильном состоянии, которое термодинамически разрешает разнонаправленные структурные переходы, но в рамках одного типа пластинчатых образований. При этом как бы срединное положение занимает блок с мозаичным распределением участков компактизации и гомогенизации. Движущей силой переходов, по-видимому, служат конформационные преобразования фибриллярного коллагена. При

прогрессивном переходе зоны компактизации расширены, возрастает объем параллельно упакованных, выпрямленных и, соответственно, расцепленных, деспирализованных коллагеновых фибрилл. При консервативном переходе волокна адгезируют, и нарастает коагуляция фибриллярного коллагена.

*Компакт-пластинки* — плоские, утолщенные пластинчатые образования, имеющие форму неправильных многоугольников (рис. 2г). Вытянутые оконечности придают пластинкам отростчатую форму. Морфологически пластинки представляют собой предельно компактизированные коллагеновые волокна, на основном протяжении слившиеся, местами вплоть до полной гомогенизации. Пластинки чаще расположены на поверхности подложки, а если в более глубоких слоях, то обязательно с вышедшими на поверхность отростчатыми оконечностями. Морфогенез компакт-пластинок не ясен. Они в 2–3 раза меньше конвергированных: длина не более 2.0 мкм, ширина ~ 1.2 мкм. Компакт-пластинки, безусловно, упрочняют коллагеновую подложку, подвергаясь действию перпендикулярных сил гидростатического сжатия. Кроме того, они испытывают деформирующее влияние разнонаправленных центробежных сил и сил растяжения. Последствия неизбежны: сложные упруговязкие переходы и напряжение, которое тем выше, чем меньше площади сечений микроструктур. Отсюда и компенсаторные мотивы трансформации субфибрилл, направленные к их объединению в компакт-пластины. Морфологические свидетельства напряженного состояния пластинок очевидны: в отростках локальные разволокнения и растрескивания, в телах — горизонтальные перемещения и просадки вещества, микроразломы и разъединения. Не менее очевиден и финал этих событий: выстраивание до полного вылушивания из сетей каркаса. Секвестрированные пластинки способны к свободному флотированию, но оно весьма ограничено — пластинки оседают не случайно, а склонны к очаговому накоплению в очагах механического напряжения. Здесь они формируют дебрис, отложения которого местами занимают обширные поля. Подобная картина отложений не обязательно маркирует только коагуляцию фибриллярного коллагена. Это может быть структурным следом локального упрочнения коллагенового каркаса в областях, например, интенсивной механической и/или дифференцировочной активности МСК.

*Концентрические пластинчатые образования* — компактизированные коллагеновые субфибрил-



**Рис. 2.** СЭМ-изображения пластинчатых образований перитенонового коллагенового каркаса: (а) стрелки – конвергированные пластинки (ростовая среда); (б) стрелка – конвергированная пластинка (остеогенная среда); (в) полиморфизм конвергированных пластинок: стрелка 1 – компактизированные волокна с четкими границами, стрелка 2 – слившиеся коллагеновые волокна с размытыми контурами (ростовая среда); (г) стрелки – компакт-пластинки (ростовая среда); (д) эллипсы – концентрические пластинки с ассиметрическими стенками в фенестрированном отверстии МСК (ростовая среда); (е) стрелка 1 – концентрическая пластинка с утолщенной ассиметричной стенкой, стрелка 2 – пластинчатое образование в коллагеновом каркасе (ростовая среда).

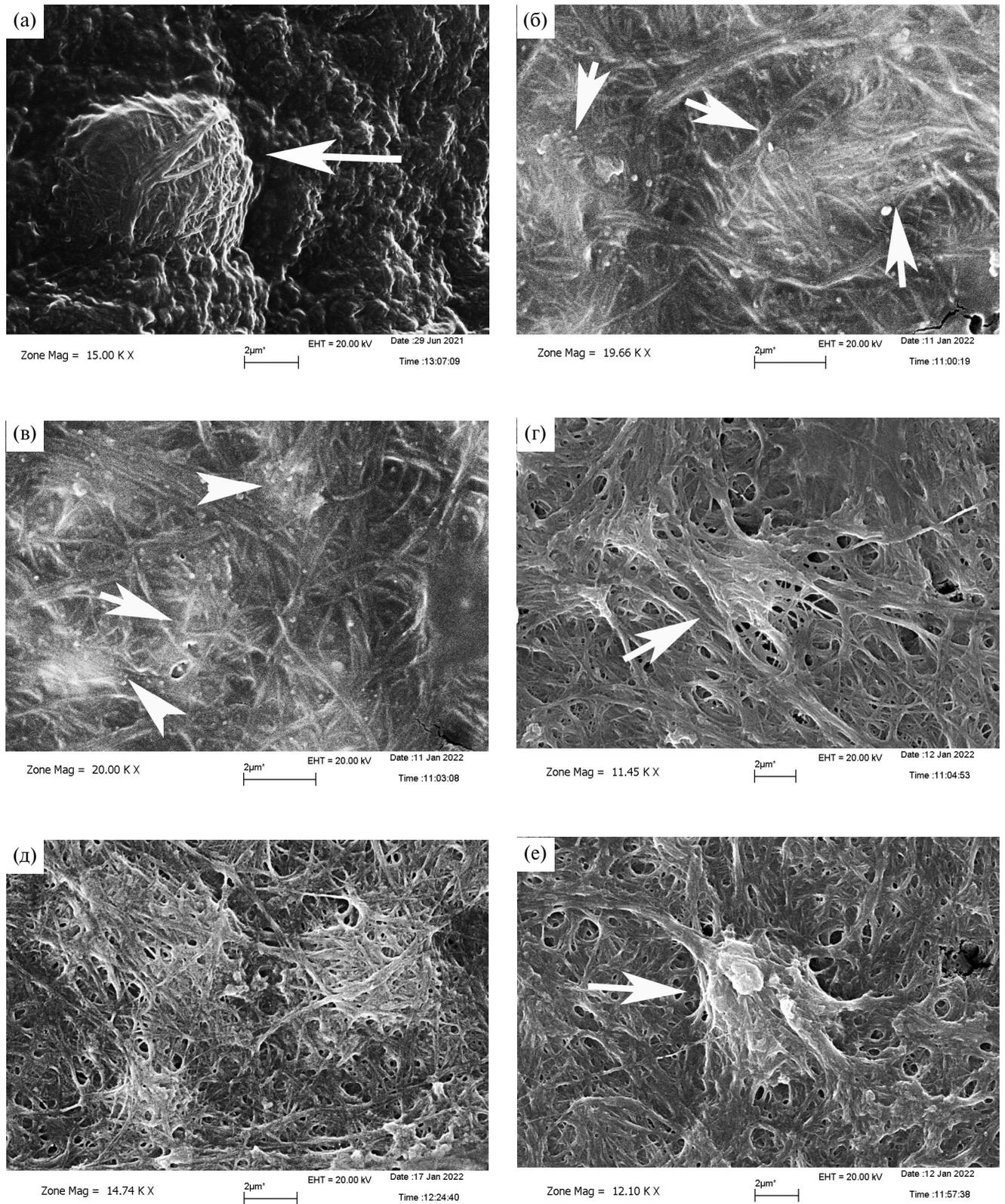
лы, плотно упакованные в плоские структуры округлой формы. Структуры в большей своей части гомоцентричны – имеют один геометрический центр, вокруг которого ориентировано довольно широкое отверстие. Размеры концентрических пластинок варьируют в пределах 1–5 мкм, диаметр отверстия – 0.5–1.0 мкм. Поверхность пластинок в основном гладкая. Однако некоторые экземпляры имеют участки либо эрозирования, либо, наоборот, напластования. При этом в очагах эрозирования обнажены, а в напластованиях – контурируют слегка выступающие над поверхностью компактизированные коллагеновые субфибриллы. В обеих ситуациях – волокна собраны в упорядоченные концентрические пакеты. Отверстие пластинок валикообразное, гладкое. Просвет чаще свободный. Пластины жестко встроены в подложку посредством трехмерных связей с волокнами не только одного верхнего слоя, но и подлежащих слоев коллагенового каркаса. По плотности упаковки фибрилл в стенке структуры разделяют на концентрические разрастания и концентрические пластинки. Концентрические разрастания имеют рыхлую стенку, коллагеновые субфибриллы которой заполняют свободное пространство межфибрилярных расщелин и пор. Концентрические пластинки – в доле в отношении этих структур не более 5–7%, расположены чаще вблизи клеток, фибриллярный коллаген в их стенках уплотнен, стенки ассиметрично утолщены и пронизаны микроотверстиями. Подобные формы расположены преимущественно на территориях крупных перфорированных фенестр МСК с обнаженной коллагеновой подложкой, в которую встроены пластины (рис. 2д). Кроме того, ассиметричные пластины отмечены и вблизи широких пластинчатых образований, растущих из глубины коллагенового каркаса (рис. 2е). Топологическая близость концентрических пластинок к дифференцирующимся МСК указывает на то, что доминирующее участие в их морфогенезе принимают коллагеновые волокна, синтезированные *de novo*. Морфогенетическая история и перспективы концентрических пластинок не ясны. Реализуют они, по-видимому, однонаправленный мотив, а именно формирование структур, канализирующих распространение тканевых жидкостей. Диапазон переходных структурных форм олигоморфный: концентрические структуры с рыхлой стенкой и концентрические пластинки с компактизированной стенкой. Ограниченное количество переходных структур с явным

доминированием предельно ранних форм (концентрических структур с рыхлой полустенкой) указывает на то, что становление этих образований относительно кратковременное и в условиях данного эксперимента остановлено на стадии структурных предикторов вследствие невысокой концентрации морфогенетических агентов и/или слабой чувствительности концентрических структур к действию сигналов.

### Клубковые структуры

Клубковые структуры – частицы неправильной округлой формы, образованные запутанными коллагеновыми волокнами. В перитеноновой подложке прослеживаются прото клубки в виде нечетко оформленных очагов запутывания субфибрилл коллагенового каркаса. Размеры прото клубков варьируют от 0.212 до 0.450 мкм, численная плотность – 3–4 экземпляра в случайно отобранном поле размером 10 × 7 мкм. Место зарождения прото клубков не ясно. Они присутствуют в перитеноновом геле *ex tempore* (рис. 3а). В перитеноновой подложке клубки нередко сконцентрированы в местах скопления фибриллярных протоузлов, образуя полиморфные очаги завихрений волокон каркаса (рис. 3б). Это свидетельствует об общности морфогенеза и, возможно, об единых механических индукентах. Фибриллярный коллаген в прото клубках предельно компактен, вплоть до полной гомогенизации, сопровождающейся кальцификацией (рис. 3в). Клубки созревают *in situ*, на что указывает отчетливая связь с коллагеновой сетью подложки, что позволяет классифицировать их как резидентные формы (рис. 3г). Зрелые резидентные клубки достигают 5–7 мкм, имеют четко структурированные центры, некоторые принимают эффектный вид, напоминающий “голову Горгоны” с “растрепанными” ветвящимися фибриллами (рис. 3д). Толщина коллагеновых фибрилл в клубках практически в два раза больше, чем во внегломерулярном каркасе (табл. 1). Одной из причин гипертрофии коллагеновых волокон может быть локальное ощелачивание экстрафибрилярного матрикса, что уменьшает суммарный поверхностный заряд коллагеновых волокон и способствует агрегации фибриллярного коллагена, в том числе и с его нефибриллярными формами (Li et al., 2009).

Показатель шероховатости коллагеновых волокон в клубках меньше, чем в волокнах каркаса, т.е. они менее сцеплены. Поры мельче (возможно, за счет сжатия клубков), но их численная



**Рис. 3.** СЭМ-изображения клубковых образований в перитеноновой подложке (ростовая среда): (а) стрелка – клубок в геле *ex tempore*; (б) стрелки – зачатки клубков в виде запутанных коллагеновых субфибрилл; (в) стрелки – протоклубки с гомогенизированным и кальцифицированными центрами; (г) стрелка – формирующийся резидентный клубок; (д) зрелые резидентные клубки; (е) стрелка – инволютивный резидентный клубок.

плотность в разы больше, чем во внеклубковом каркасе (табл. 1). Повышенная пористость делает резидентные клубки хорошо проницаемыми для тканевых флюидов. Клубки располагают и фибриллярными узлами, но в сравнении с каркасными их меньше, они более крупные и с меньшей связностью (табл. 1). Поверхностная площадь коллагеновых фибрилл обратно зависит от диаметра клубков — по мере увеличения диаметра показатель  $S_v$  прогрессивно регрессирует (табл. 2). При этом в размерном диапазоне диаметров начиная примерно с 1.5–2.5 мкм поверхностная площадь клубков резко падает (табл. 2). Соотношения диаметров и показателей  $S_v$  свидетельствуют о том, что в ходе гломерулогенеза структура резидентных клубков регрессирует, они теряют свободную энергию, но приобретают термодинамически выгодную стабильность. Большая часть резидентных клубков, структурированных в каркас, — это в основном мелкие формы диаметром 2–3 мкм.

Функциональное предназначение резидентных клубков в достаточной мере предсказуемо, и оно тесно связано с их структурной динамикой. В морфологическом отношении резидентные клубки представляют собой крупные конгломераты огрубевших фибриллярных узлов, что увеличивает способность акцептировать механическую энергию и составляет прямое следствие длительных механических напряжений. Морфологически напряженное состояние верифицируют по появлению деформационных структур, что делает, в частности, СЭМ-анализ полезным диагностическим инструментом. В малоразмерных формах центры резидентных клубков достаточно мономорфны и состоят из фракции переплетенных хорошо структурированных коллагеновых фибрилл и поровых пространств. Появление крупных форм клубков (диаметром больше 10 мкм), возможно, происходит по механизму прогрессирующего слияния

протоклубков в малые кластеры и далее в большие их группы, в которых отдельные крупные формы клубков в конечном итоге утрачивают свою целостность (Tosh et al., 2003). В дальнейшем по мере увеличения размеров клубков объем деформационных структур в клубках возрастает: тело во всем объеме коллабирует и формирует сплошной бесструктурный коллагеновый массив, количество фибриллярных ответвлений снижено, волокна укорочены, утолщены и огрубевают. На окончательной стадии инволюции клубки уменьшены в размерах, гомогенизированы и уплотнены в центре, но в периферических отделах, наоборот, разрыхлены и разволокнены. Клубки приподняты над каркасом. Секвестрирующие клубки импрегнированы кальцийфосфатами не апатитовой природы (рис. 3e). С учетом вышеописанного, один из функционалов резидентных клубков, по-видимому, опосредует изоляцию структурных последствий упругих и вязких напряжений с последующим удалением деформированного коллагенового материала из каркаса. Подчеркнем, что процессы инволюции не распространены на весь объем коллагенового каркаса подложки, а отмечены только в клубках. Это свидетельствует о неоднородности структуры и физико-химических свойств фибриллярного коллагена: в клубках протеин более чувствителен, а в коллагеновой сети, наоборот, более устойчив к действию факторов инкубационной среды. Механизмы инволюции до настоящего времени не ясны. Один из них, и в частности флокуляция, инициирован с момента зарождения клубковых зачатков, когда вследствие запутывания функциональные группы фибриллярного коллагена и вмещающей фазы взаимно проникают, что, собственно, и провоцирует флокуляцию. Этому также способствует и замедление диффузионных потоков дисперсионной среды, обусловленное усложнением структуры поверхности коллагеновой фракции клубков.

**Таблица 2.** Значения размеров и удельных площадей поверхностей резидентных клубков при культивировании 14 сут на перитеноновой подложке в ростовой среде

Показатель	Ранжированные значения морфометрических параметров клубков						
	1	2	3	4	5	6	7
Номера размерных рангов							
Диапазон рангов, шаг 0.5 мкм	До 0.5	0.6–1.0	1.1–1.5	1.6–2.0	2.1–2.6	2.6–3.5	4.2–6.6
Диаметр клубков ( $D$ ), мкм	0.451	0.721	1.120	1.710	2.620	3.600	6.410
Удельная площадь поверхности клубков ( $S_v$ ), мкм <sup>2</sup> /мкм <sup>3</sup>	11.80	11.12	1.11	9.60	7.90	3.40	2.80

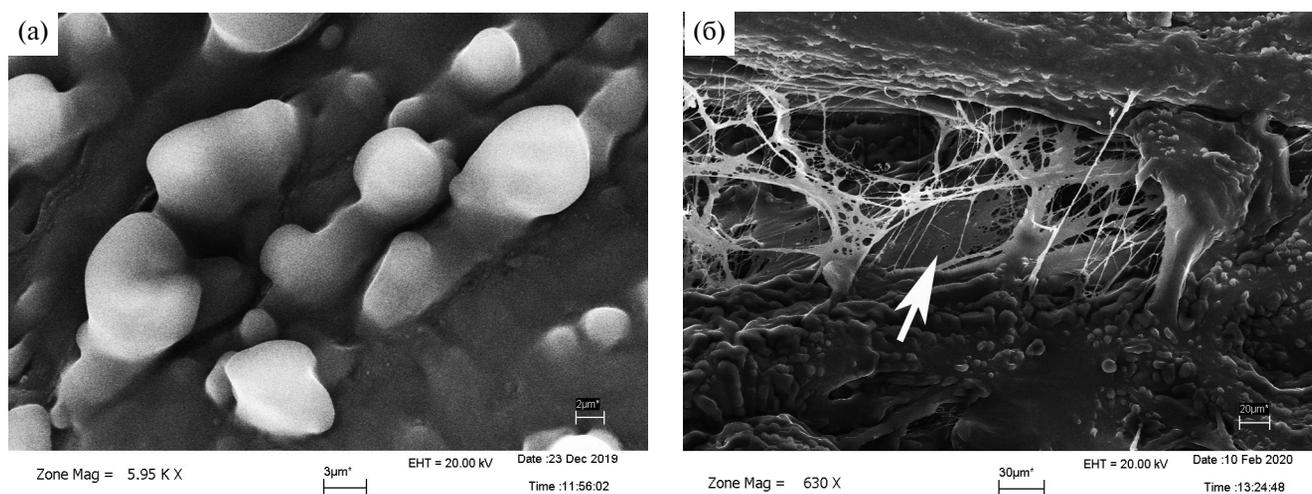
В такой ситуации рост локальной вязкости неизбежен, что, в свою очередь, ускорит образование гелевых зародышей, их захват и инкапсуляцию структурирующимися клубками (Wilson et al., 2014). В результате во внегломерулярном каркасе может возникнуть относительный дефицит центров гелеобразования и, соответственно, центров ренатурации, основной которой считают самосборку фибриллярного коллагена (te Nijenhuis, 1981; Djabourov et al., 1993; Ronsin et al., 2017). Так, по-видимому, реализован еще один функционал клубков – поддержание равновесия в системе отношений “гломерулогенез–структурирование каркаса”. При сдвиге в сторону первого ослабнет структурирование второго.

#### *Глобулы перитенонового геля и сфероиды подложки*

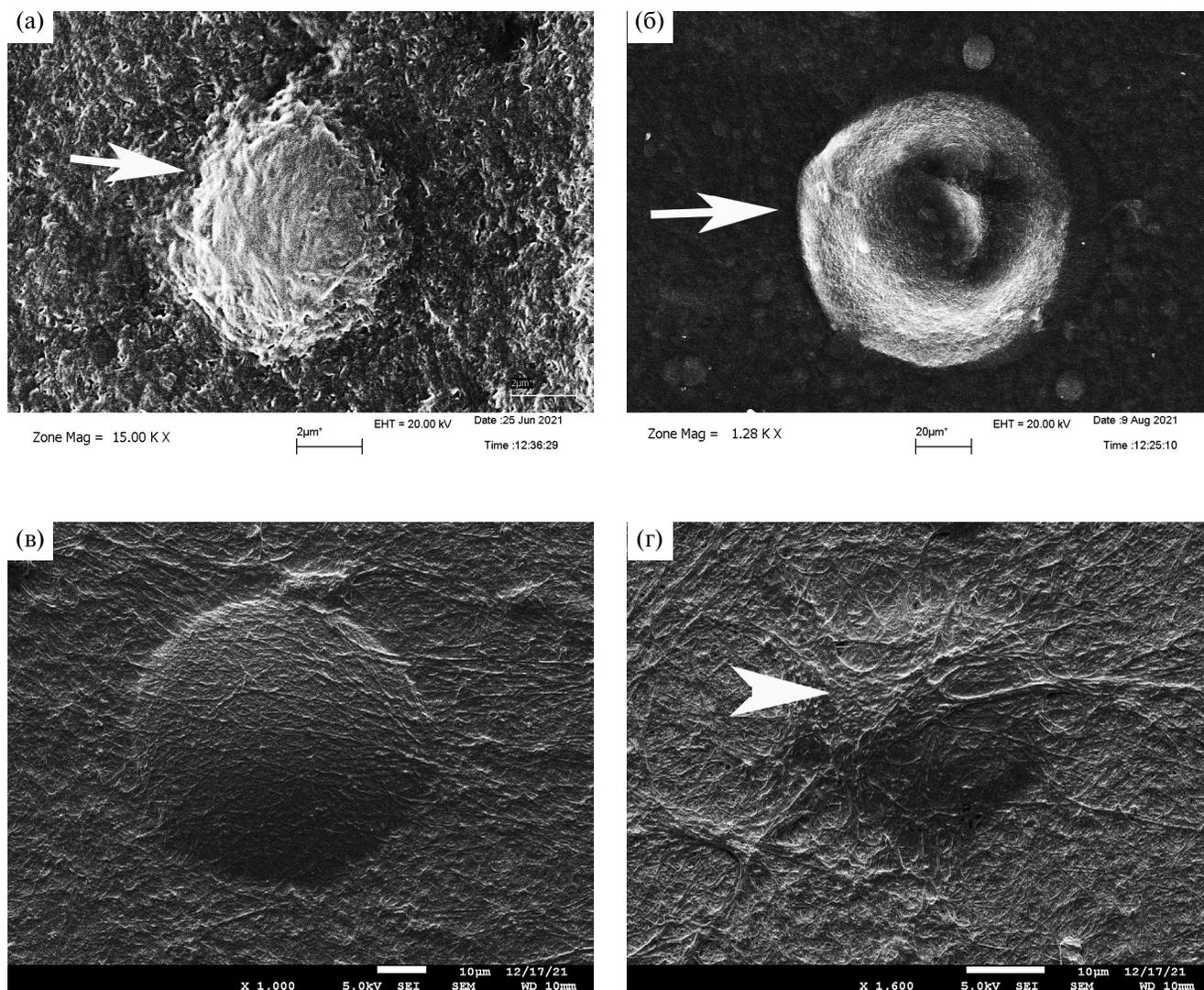
Эксклюзивным структурным компонентом перитенонов *in vivo* признаны сесамовидные глобулы – округлые частицы с плотной, гладкой оболочкой (рис. 4а). Размеры глобул варьируют, и они способны к полному или частичному разделению. Основная часть глобул расположена в сесамовидных островках – переходных структурах в гистогенетическом ряду хрящевая–костная ткань. Основная часть глобул слита с матриксом островков, что свидетельствует о химическом сродстве этих структур, склеивающую основу которых составляют протеогликаны. Цитогенетическим источником глобул выступают матриксные везикулы, синтезируемые в теноцитах. По выходе из последних матриксные везикулы

мигрируют во внеклеточном матриксе, стремясь к расселению вблизи островков. Фундаментальным структурно-функциональным атрибутом перитенонов считают склонность фибриллярного коллагена к компактизации с образованием тонких пластинок (рис. 4б).

В геле *ex tempore* явно вследствие кислотного и щелочного воздействия глобулы деформированы: уменьшены в размерах, сжаты, их оболочка приобретает складчатость и фестончатость по краям, глобулы покрыты набухшими коллагеновыми волокнами, закрывающими от осмотра собственную мембрану (рис. 5а). Проникнув в подложку из геля, сесамовидные глобулы приобретают форму сфероидов: происходит восстановление формы и размеров, выравнивание поверхности оболочек, исчезает фестончатость краев. В итоге в большей своей части сфероиды подложки приобретают вид морфологически близкий к исходному состоянию сесамовидных глобул в перитенонах *in vivo*, но для некоторых форм агрессивное химическое воздействие имеет последствие: в подложке обнаружены деформированные сфероиды (рис. 5б). В зависимости от взаимоотношения с коллагеновым каркасом сфероиды подложки классифицированы на застывшие и растущие формы. Застывшие сфероиды морфологически идентичны сесамовидным глобулам перитенонового геля *ex tempore*, но они более крупные – диаметр достигает 45–60 мкм. В сфероидах подложки фибриллярный коллаген отсутствует, но снаружи они покрыты оплеткой из утолщенных коллагеновых волокон (рис. 5в) и/или ветвящимися цитоплазматическими от-



**Рис. 4.** СЭМ-изображения сесамовидных глобул в перитеноне *in vivo*: (а) стрелки – сесамовидные глобулы; (б) стрелка – пластинчатая компактизация коллагеновых фибрилл.



**Рис. 5.** СЭМ-изображения застывших сфероидов в геле *ex tempore* и подложке (ростовая среда): (а) стрелка – сесамовидная глобула в геле; (б) стрелка – деформированный сфероид; (в) застывший сфероид в глубине коллагенового каркаса; (г) стрелка – застывший сфероид, покрытый коллагеновыми волокнами и цитоплазматическими отростками.

ростками прилежащих клеток (рис. 5г). Механизм утолщения коллагеновых волокон неоднозначен. Отметим, что в большей части волокон прослежены морфологические признаки характерной поперечной исчерченности, обусловленной D-периодичностью фибриллярного коллагена I типа. Кроме того, волокна имеют четкие контуры границ раздела. Это указывает на то, что волокна не набухшие, а их утолщение, возможно, обусловлено интенсивными процессами самосборки микроволокон с признаками внутрифибриллярной адгезии. В коллагеновой оплетке присутствуют поровые структуры в виде широких межфибриллярных расщелин. По-

верхность на обнаженных участках сфероидов гладкая, что предопределяет слабость адгезионных взаимодействий. В периферических отделах сфероиды уплотнены, границы по периметру четкие, ровные, отстоят отдельно и не деформируют сетчатую структуру коллагенового каркаса подложки. Метаморфозы застывших сфероидов не известны, инкапсуляция, несомненно, снижает их функциональную активность. Вместе с тем морфологические особенности инкапсуляции больше похожи на обратимое состояние: оплетка не препятствует разделению составных форм сфероидов, подготовленных к структурной и, соответственно, метаболической раскон-

сервации. Вероятность перехода в активное состояние, возможно, возрастает, если сфероиды попадают в другую экологическую среду, например, в зону действия морфогенов МСК. Во всяком случае при приближении к МСК сфероиды переходят в верхние слои каркаса, стремясь к высвобождению от коллаген-цитоплазматической оплетки, их оболочка разрыхлена, что свидетельствует об усилении метаболической активности, чему способствует в том числе и широкое раскрытие окологлобулярных пор каркаса.

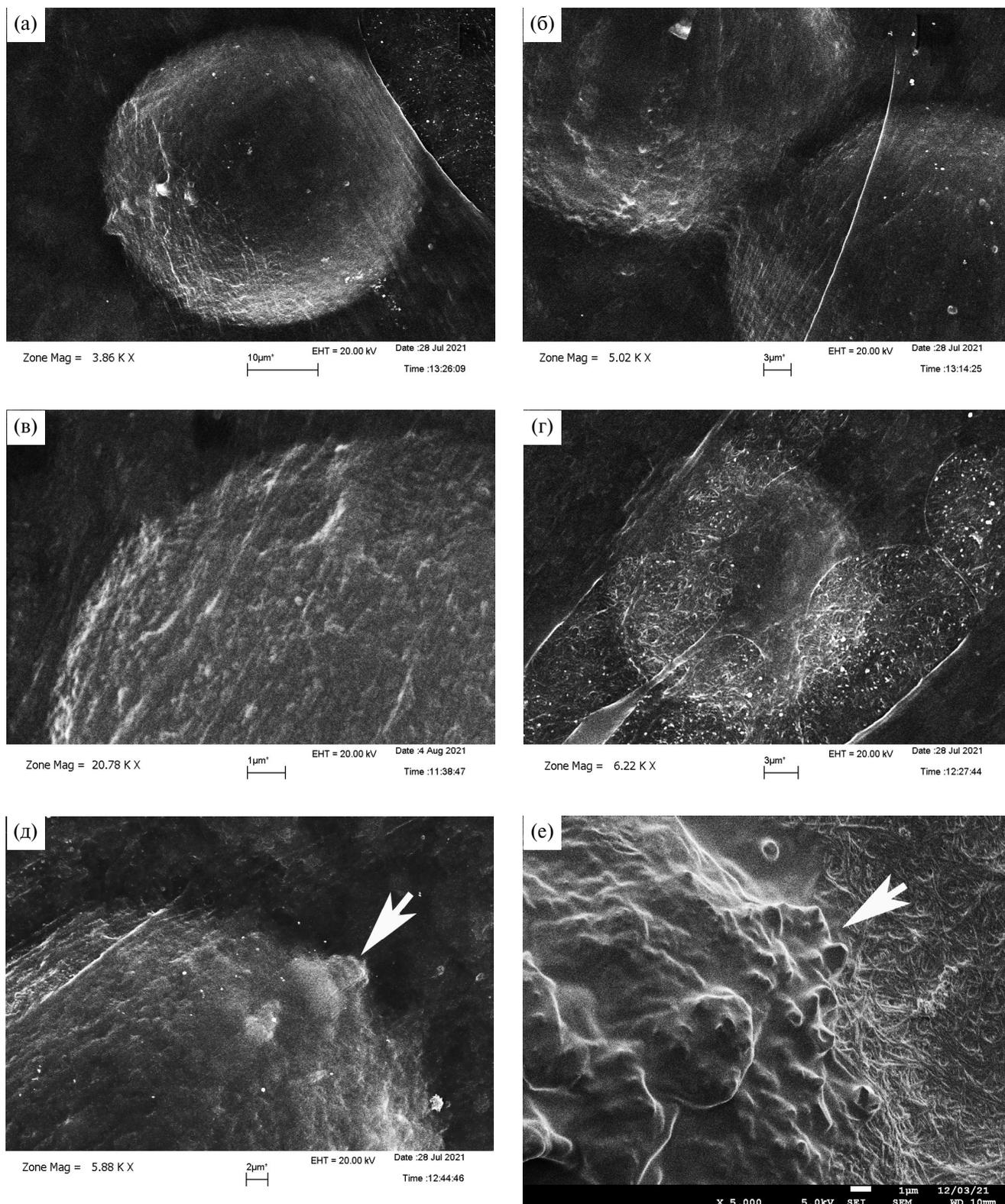
Второй вид сфероидов – это растущие формы, свободно расположенные на поверхности подложки (рис. 6а). В растущих сфероидедах покрытие коллагеновыми волокнами и цитоплазматическими мембранами не структурировано в подложку, что делает их подвижными. В условиях *in vitro* растущие сфероиды, по-видимому, приоритетно воспринимают стимулирующее воздействие химических агентов питательной среды. Это ускоряет их рост – диаметр достигает 70–90 мкм, но это не приводит к активации каких-либо тканеспецифичных дифференцировочных процессов. Основная часть растущих сфероидов пребывает в разрозненном состоянии. Но немало и составных форм, образованных двумя и более частицами (рис. 6б). Морфогенез растущих сфероидов сложен. Некоторые из них адгезируют при простом сближении с полным или частичным слиянием, другие пребывают в метастабильном состоянии разделения/слияния. При максимальном сближении растущие сфероиды непосредственно контактируют, сохраняя непрерывной границу раздела. При слиянии – граница в области контакта частично или полностью прорастает коллагеновыми субфибриллами. Разделение чаще незавершенное и асимметричное. Растущие сфероиды демонстрируют повышенную функциональную активность: поверхность приобретает шероховатость, поры открыты (рис. 6в). Наружную поверхность сфероидов покрывает цитоплазматическая мембрана, пронизанная сквозными, достаточно крупными фенестрами (рис. 6г).

Роль сфероидов в морфогенетических процессах при совместном культивировании с МСК в ростовой питательной среде ограничена слабой активностью процессов структурирования кальцийфосфатов. Морфологически это выражено в виде одиночных игольчатых минеральных разрастаний под цитоплазматической мембраной или на наружной поверхности растущих сфероидов, иногда осаждающихся на поверхно-

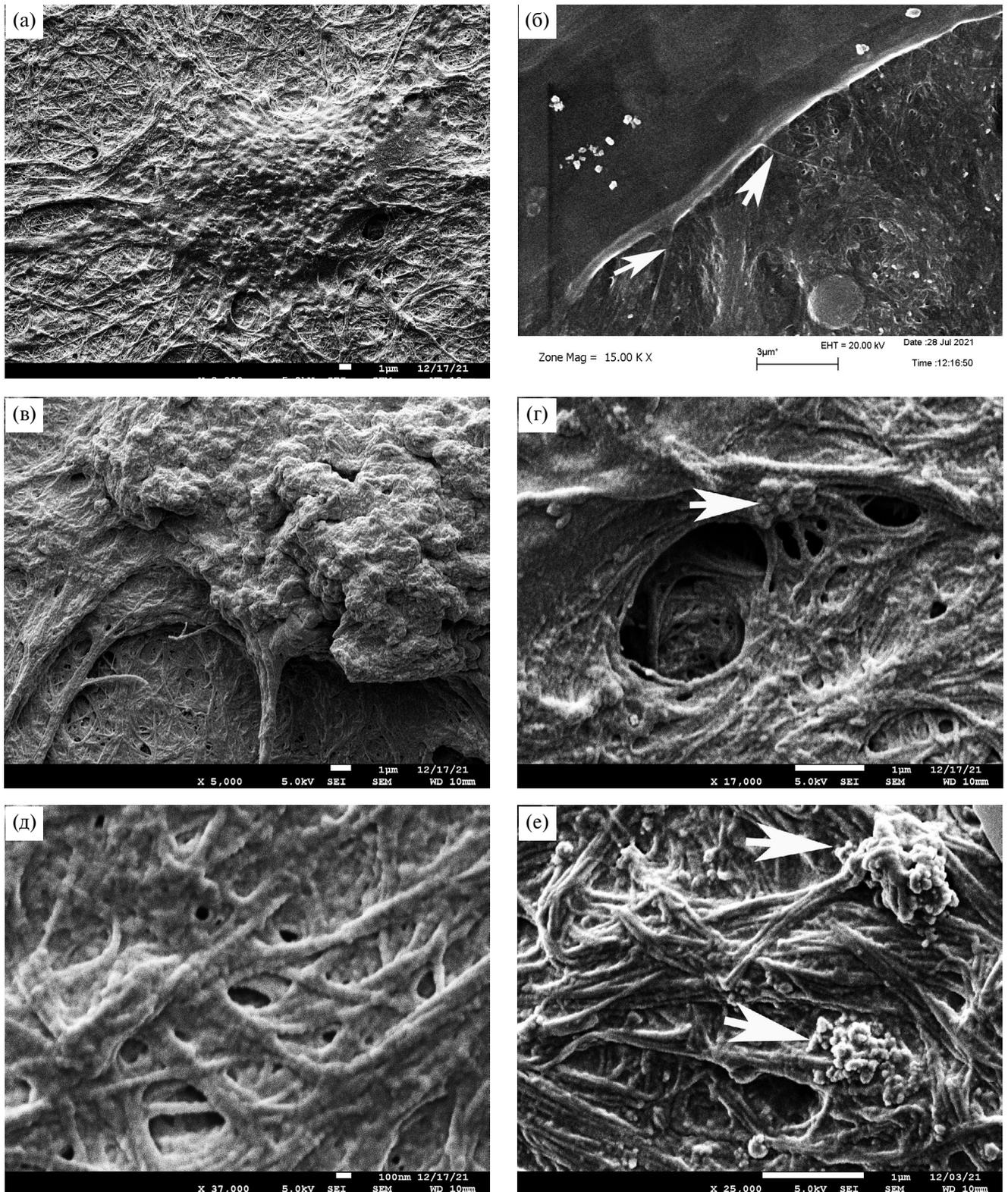
сти коллагеновых субфибрилл (рис. 6д). Форма отложений кальцийфосфатов схожа с таковой при минерализации коллагеновых волокон и часто заметна в оссифицирующейся фиброзной ткани. Игольчатая форма разрастаний характерна для роста гидроксиапатитов в свободный объем и структурирования кальцийфосфатов по механизму гомогенной нуклеации. Это точечный, но довольно специфичный признак структурирования минеральной фазы в среде коллагеновой ткани по остеогенному направлению. При культивировании в остеогенной питательной среде структурирование кальцийфосфатов многократно интенсифицировано: в каркасе возникают сверхкрупные глобулы (диаметром до 100–120 мкм), покрытые непрерывной цитоплазматической мембраной, под которой контурируют четко ограненные (4–6 граней) микрокристаллы кальцийфосфатов (рис. 6е). Механизм стимуляции апатитогенеза в сфероидедах не известен, но поскольку столь масштабные проявления наблюдали только в присутствии клеток, возможно, сфероиды абсорбировали остеоген-индуцирующие агенты, синтезируемые дифференцирующимися МСК. Сохраняет актуальность вопрос о том, насколько этот процесс адаптивен по отношению к структурирующемуся каркасу и насколько он эффективен как остеостимулирующий фактор. Ведь гидроксиапатит расположен внутри сфероидов, окружен цитоплазматической и коллагеновой мембранами, что может сдерживать участие данного кальцийфосфата в морфогенезе остеонидных структур. Кроме того, состав, структура и биологическая активность новообразованного гидроксиапатита не известны.

#### *Клеточно-опосредованные структуры*

При культивировании на коллагеновой матрице из перитенонового геля крепление дифференцирующихся МСК к подложке происходит посредством плоских цитоплазматических отростков, выпускающих множественные коллагеновые волокна, сплетающиеся с волокнами каркаса (рис. 7а). Прикрепления клеток к коллагеновым подложкам рассматривают как адгезивные взаимодействия с вынужденной асимметрией, свойственной двумерным культурам (Beningo et al., 2004). При этом клетки, прикрепляющиеся к перитеноновой подложке при культивировании как в ростовой, так и остеогенной питательных средах, демонстрируют филоподиальную систему в виде узких длинных



**Рис. 6.** СЭМ-изображения растущих сфероидов в перитеноновой подложке (ростовая и остеогенная среды: (а) сфероид на подложке (ростовая среда); (б) составной растущий сфероид; (в) растущий сфероид с шероховатой поверхностью и открытыми порами (ростовая среда); (г) растущий сфероид, покрытый фенестрированной цитоплазматической мембраной (ростовая среда); (д) стрелка – очаговые разрастания на поверхности растущего сфероида (ростовая среда); (е) стрелка – растущий сфероид с микрокристаллитами кальцийфосфатов (остеогенная среда).



**Рис. 7.** СЭМ-изображения МСК и матричных везикул: (а) прикрепление посредством цитоплазматических отростков, выпускающих многослойную сеть коллагеновых волокон (ростовая среда); (б) стрелки – прикрепление посредством филоподий в виде актиновых “усов” (ростовая среда); (в) матричные везикулы, контурирующие под мембраной МСК (ростовая среда); (г) стрелка – матричные везикулы в месте экстррузии коллагенового материала (ростовая среда); (д) стрелки – гроздевидные скопления матричных пузырьков и гранул кальцийфосфатов на поверхностях коллагеновых волокон (остеогенная среда).

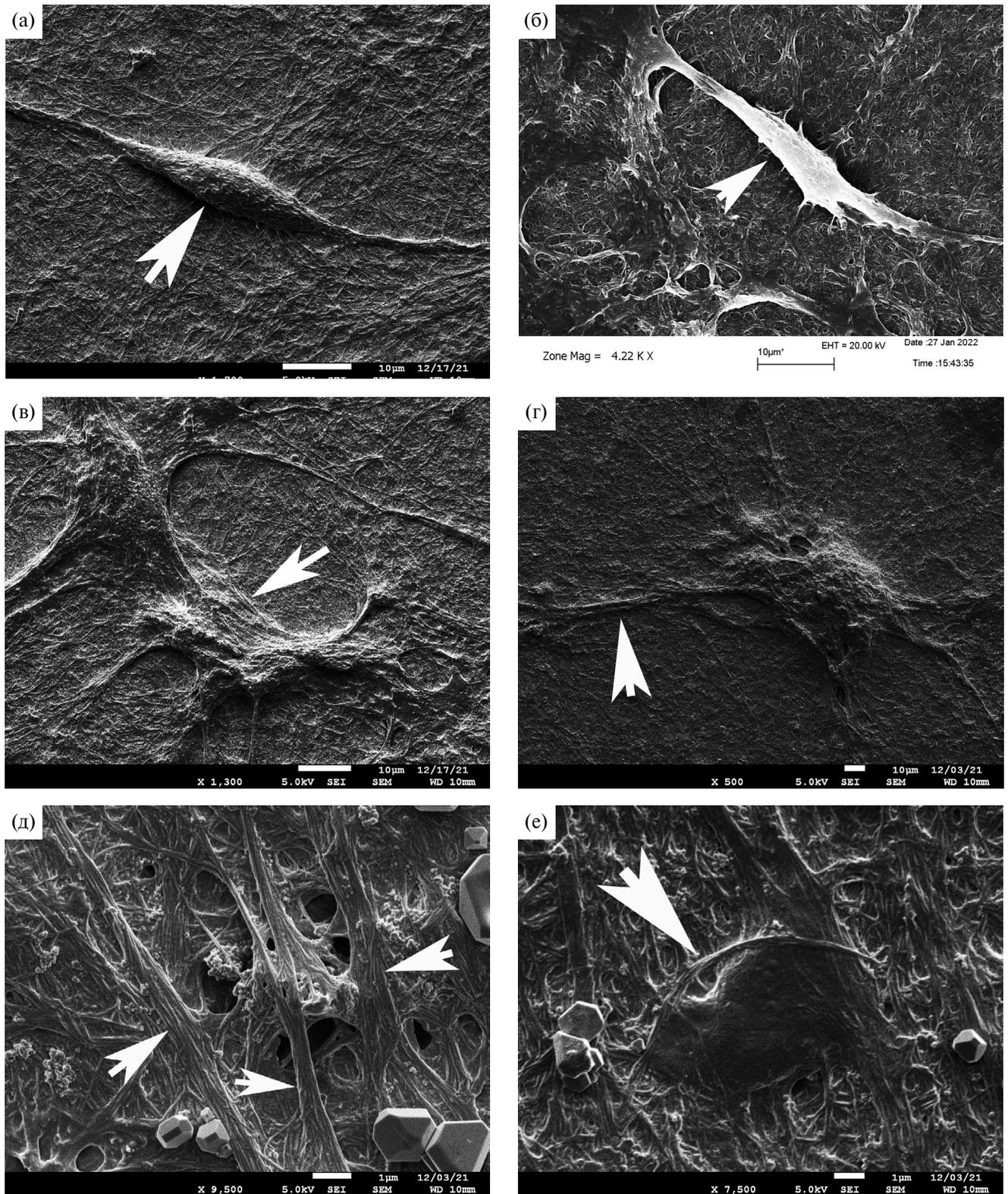
усоподобных цитоплазматических отростков, пронизанных нитями актина (рис. 7б). Это прямое следствие повышенной жесткости и более высокого натяжения фибриллярного коллагена (Grinnell et al., 2003). Прикрепление клеток к каркасу из перитенонового геля сходно с таковым в трехмерных культурах *in vitro*, а также в тканях *in vivo* (Hongmei, Grinnell, 2005; Langevin et al., 2005). Описанные способы прикрепления клеток опосредованы достаточно ранним действием тканеформирующих механических сигналов (жесткость и натяжение), исходящих из перитеновой подложки.

МСК активно синтезируют матриксные везикулы, что заметно в виде множества контурирующих под мембранами частиц (рис. 7в). При культивировании в ростовой питательной среде концентрирование матриксных везикул происходит вблизи МСК, они оседают на экстралируемом коллагеновом материале (рис. 7г). На остальном протяжении подложки численная плотность везикул значительно меньше – распространению везикул, возможно, препятствует высокая плотность упаковки коллагеновых фибрилл (Genin et al., 2009). При культивировании в остеогенной среде везикулы широко распространены в подложке, в которой они формируют минерализующиеся матриксные пузырьки, оседающие на поверхностях коллагеновых волокон (рис. 7д). Если в гранулах гидроксиапатит и присутствует, то скорее дефицитный по кальцию, так как минерализованные частицы склонны к дезагрегации на мелкие бесформенные гранулы, что характерно для ранних стадий первичной минерализации коллагеновых волокон (Amizuka et al., 2014). Риски гиперминерализации каркаса очевидны: падение эластичности, избыточная жесткость и хрупкость.

*Теноцитоподобные клетки и сухожилеподобные структуры.* Теноцитоподобные клетки – узкие, вытянутые, ядра их слабо контурируют под цитоплазматической мембраной, расположены эксцентрично. Диаметр клеток варьирует в пределах 7–10 мкм в широкой части. Поверхность клеток шероховата за счет множественных мелких складок, вытянутых вдоль длинной оси. Местами складки имеют вид остроконечных шиповатых цитоплазматических выступов. Отходящие из базальных поверхностей выступы выпускают тонкие коллагеновые фибриллы, которые крепят клетки к каркасу. Отметим, что веретенообразные клетки присутствуют при культивировании как в ростовой, так и в остеогенной питательных средах (рис. 8а, б). При реализации

в теногенном направлении дифференцировки по мере созревания зрелые теноциты приобретают веретенообразную форму. Элонгированная форма клеток, эксцентриситет ядер, вытянутые, изгибающиеся формы клеток положительно коррелируют с экспрессией генов и синтезом соответствующих теномаркеров (Franchi et al., 2007; Hadate et al., 2020; Eren et al., 2021). Сухожилеподобные структуры – синтезированные внутри клеток нити протоколлагена, секретированные во внеклеточный матрикс и собранные в микропучки. На начальных этапах на боковых поверхностях отростчатых клеток возникает пакет компактизированных субфибрилл, выступающий во внеклеточное пространство в области сквозных фенестр (рис. 8в). Далее коллагеновые субфибриллы, собранные в тяж толщиной 1.5–2.5 мкм, растут вдоль длинной оси, формируя шнур из плотно упакованных фибрилл, расщепляющийся на дистальном конце (рис. 8г), длина которого достигает 110–140 мкм. Приведенные особенности роста, форма и размеры микропучков подобны эмбриональным зачаткам сухожилий, появляющимся также и в регенерирующих сухожилиях (Ingraham et al., 2003; Bayer et al., 2010).

*Лигаментоподобные структуры* – группы волокон, расположенных параллельно друг другу в виде прочно склеенных лент – коллагеновых полос (Heubeli et al., 2016). Основная часть лент расположена на поверхности подложки, но чаще над крупнозернистыми частицами кальцийфосфатов, погруженных в коллагеновый каркас (рис. 8д). Отметим, что лигаментоподобные структуры встречены при культивировании в остеогенной среде, где они реализуют главное филогенетическое предназначение: *in vivo* – ограничение избыточной подвижности связываемых компонентов (суставов), *in vitro* – сдерживание распада конгломератов кальцийфосфатов и изоляция их отложений. Морфогенез лигаментоподобных структур при культивировании *in vitro* во многом не ясен. Но точно известно, что они представляют собой производные фибробластов, трансформирующихся в конечном итоге в лигаментоциты, с редуцированными формами которых коллагеновые полосы образуют скрученные вдоль длинной оси структуры (Benjamin, Ralphs, 2000; Tresoldi et al., 2013). Аналогичные структуры обнаружены и в каркасе в виде неправильной формы клубков с закрученными и слившимися вплоть до полной гомогенизации волокнами, составляющими неразделимую часть прилежащих коллагеновых полос, прояв-



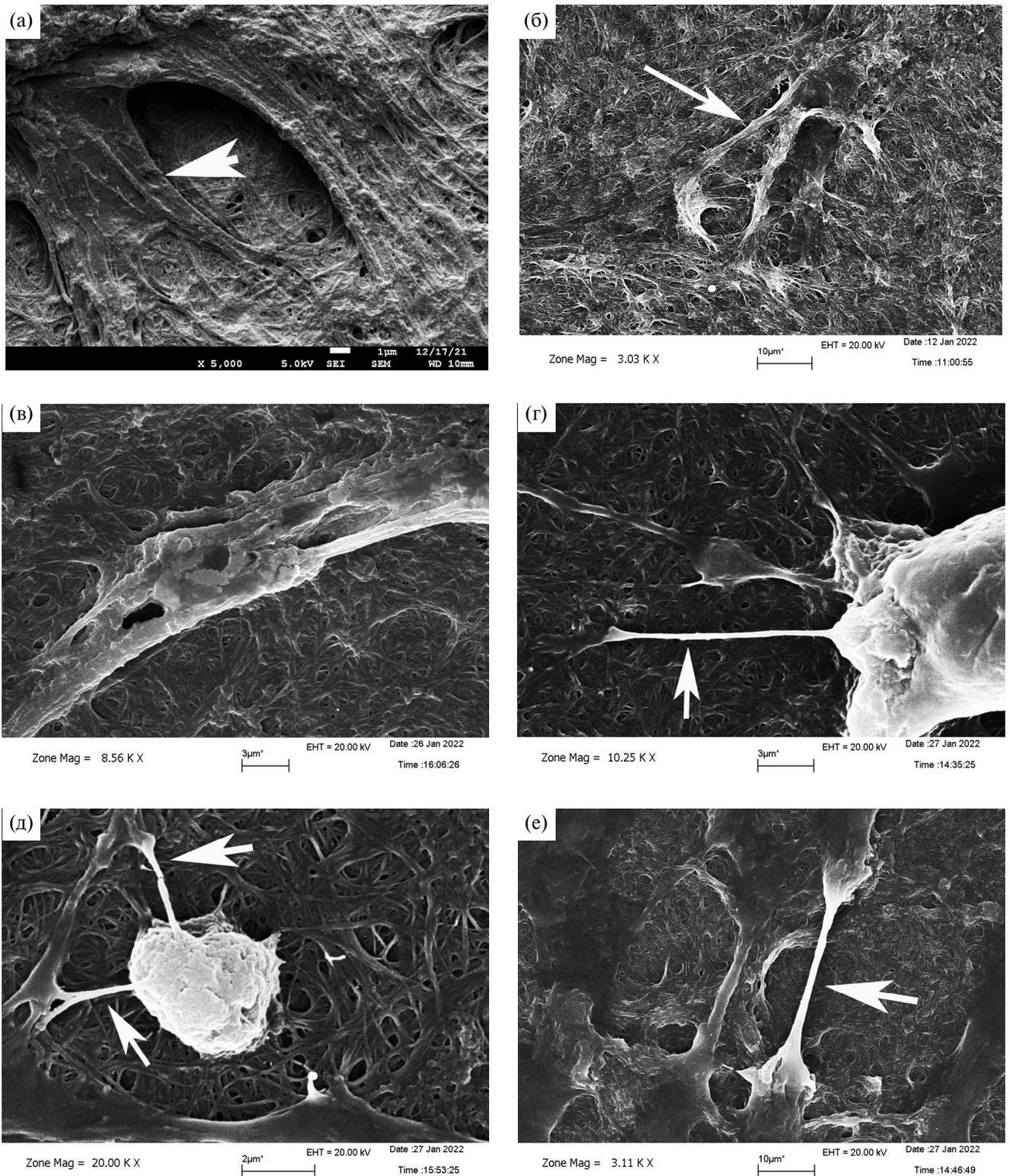
**Рис. 8.** СЭМ-изображения тено- и лигаментоподобных структур в коллагеновом каркасе: (а) стрелка – веретенообразная клетка (ростовая среда); (б) стрелка – веретенообразная клетка (остеогенная среда); (в) стрелка – коллагеновые субфибриллы, собранные на боковой поверхности отростчатой клетки (ростовая среда); (г) стрелка – отростчатая клетка с расщепленным минерализованным отростком (ростовая среда); (д) стрелки – лигаментоподобные структуры, “переброшенные” через конгломерат кальцийфосфатов (остеогенная среда); (е) стрелка – лигаментоподобная полоска ассоциации с клубком и эластическим волокном (остеогенная среда).

ляющих также и повышенный аффинитет к эластическим волокнам (рис. 8е).

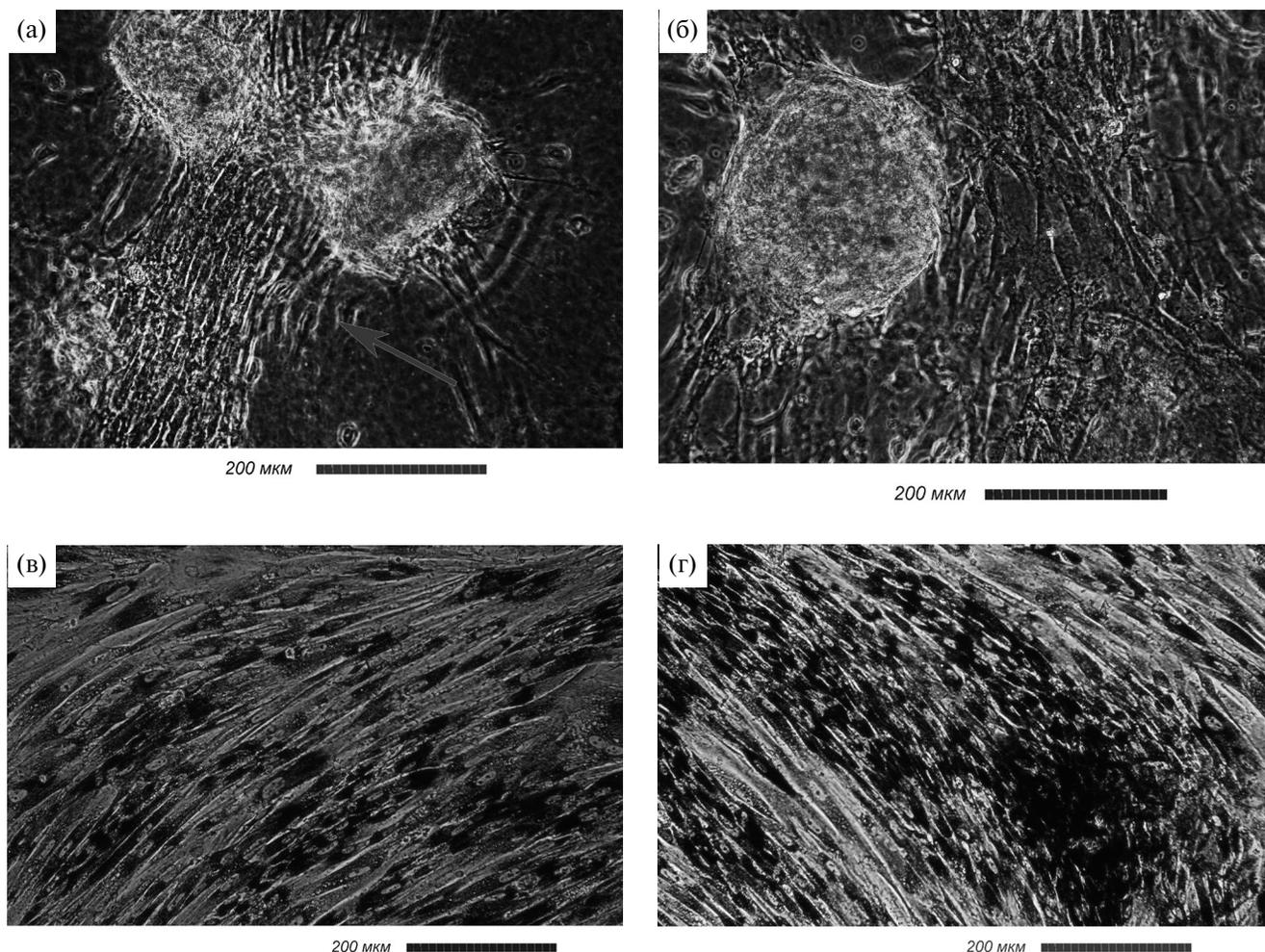
**Остеоидные образования** – полиморфные структуры в виде ламелл, трабекул и костных узелков, гистогенетически связанные с остеоцитоподобными клетками, продуцирующими фибриллярный коллаген. Ламеллы – пластинчатые структуры, выталкиваемые в экстрацеллюлярное пространство из боковых отделов клеток (рис. 9а). Размеры ламелл варьируют в пределах 5–15 мкм. Форма зрелых ламелл полигональная, краевые отделы уплотнены и частично минерализованы, дистальные отделы структурированы в коллагеновый каркас. Основными отличиями от компактных пластинок можно считать гистогенетическую связь с клетками, наличие отверстий гаверсоподобных каналов, отростчатую форму и минерализацию (рис. 9б). Трабекулы – это вытянутые в виде костных балок фиброзные тяжи, образованные плотно упакованными коллагеновыми фибриллами (рис. 9в). Длина трабекул – 30–70 мкм, ширина в срединных участках – 3–11 мкм. Анатомически трабекулы составляют часть компактизированных коллагеновых пучков, исходящих из МСК, дифференцирующихся в остеоцитарном направлении. На это указывает ветвящаяся форма клеток с множественными цитоплазматическими отростками, продолжением апикальных отделов которых служат минерализованные коллагеновые пучки. Костные узелки – это локальное скопление вытянутых клеток с хорошо развитыми цитоплазматическими отростками. В условиях *in vivo* подобные структуры возникают в эмбрионах и регенерирующей костной ткани (Wang et al., 2021). Особенность узелков состоит в наличии межклеточных мостиков, образованных цитоплазматическими отростками, переплетающихся с коллагеновыми волокнами и формирующих плотно упакованные смешанные структуры. Структура сети межклеточных цитоплазматических отростков слоистая. В глубинных слоях отростки широкие, короткие, выпускающие тонкие коллагеновые волокна, вплетающиеся в коллагеновый каркас подложки. Поверхностные слои остеоподобных узелков при культивировании в остеогенной среде образованы минерализованными остеоцитоподобными клетками, выпускающими узкие (шириной 150–250 нм), короткие (2–6 мкм) цитоплазматические отростки, имеющие вид спикул эмбриональных остеоцитов (рис. 9г). Дистальные оконечности спикул либо вплетены в коллагеновый каркас (рис. 9д), либо посредством дигитаций

прикреплены к прилежащим трабекулоподобным структурам (рис. 9е). Оссифицирующиеся узелковые структуры заметны при культивировании как в ростовой, так и в остеогенной среде, но исключительно на перитеноновой подложке. В ростовой среде цитоплазматические отростки образуют рыхлую сеть, в остеогенной – сплошную (рис. 10а, б). В ростовой среде активность щелочной фосфатазы средняя (рис. 10в) и высокая – в остеогенной (рис. 10г). Внеклеточный матрикс вокруг цитоплазматических отростков уплотнен, насыщен кальцийфосфатами, что позволяет предположить формирование аморфизированных фракций гидроксиапатита, обнаруживаемых и на более поздних стадиях созревания костных узелков (Ghita et al., 2014). В трабекулоподобных образованиях, в цитоплазматических отростках остеоидных узелков сдвиг границ минерализации прослежен в проксимально-дистальном направлении, что отражает не только соответствующий градиент жесткости минерализующихся волокон, но и механизм формирования непрерывной минеральной связности, перемещающейся от одного конца волокна к другому (Genin et al., 2009). Интенсивность минерализации, ее направленность, а также преимущественно внутриклеточная локализация свидетельствуют о том, что эти процессы происходят по механизму внутримембранозной минерализации и оссификации на ранних стадиях. Все пластинчатые и трабекулоподобные остеоидные структуры перфорированы сквозными отверстиями с гладкими краями. Гаверсификация и минерализация, несомненно, упрочняют остеоидные структуры и составляют важный механизм твердотельной организации оссифицирующихся образований.

**Энтезоподобные структуры** – это структуры, которые обеспечивают скрепление в межфазной зоне механически разнородной переходной ткани (Rossetti et al., 2017). В условиях *in vitro* энтезоподобные структуры возникают при культивировании на перитеноновой подложке преимущественно в остеогенной среде в виде четко оформленных по характеру минерализации переходных зон в области скрепления остеоидных образований с коллагеновым каркасом. Ламеллы фиксированы по механизму инфильтрации компактизированных отростков вглубь коллагенового каркаса (рис. 11а). В области прикрепления трабекулоподобных образований к каркасу прослежены гребневидные структуры: дистальные оконечности трабекул расширены и веерообразно расплетены на 3–5 отростков, обра-



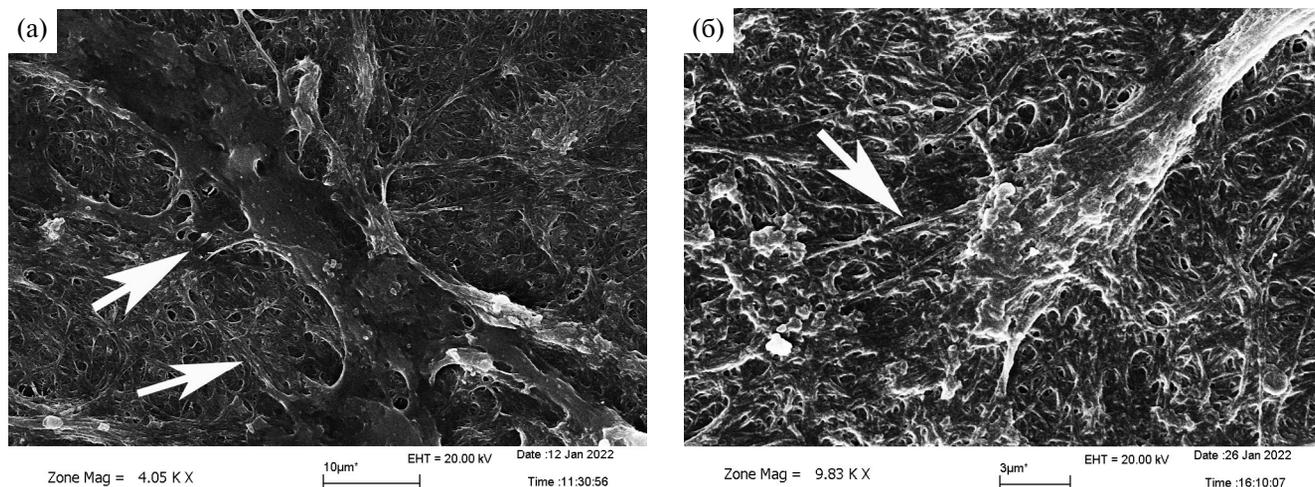
**Рис. 9.** СЭМ-изображения остеоидных структур: (а) стрелка – пластинчатая структура, выталкиваемая из МСК (ростовая среда); (б) стрелка – ламелла с минерализованными краевыми отделами (ростовая среда); (в) минерализованная костная трабекула с гаверсоподобными отверстиями (ростовая среда); (г) стрелка – спикула, встроенная в коллагеновый каркас (остеогенная среда); (д) стрелки – спикулы, соединяющие минерализованную остеоцитоподобную клетку с трабекулой (остеогенная среда); (е) стрелка – спикула, соединенная дигитацией с клеткой (остеогенная среда).



**Рис. 10.** Светомикроскопические изображения структуры остеоподобных узелков и отложений диформаза: (а) рыхлая сеть цитоплазматических отростков в узелке (ростовая среда); (б) плотная сеть цитоплазматических отростков в узелке (остеогенная среда); (в) средняя активность щелочной фосфатазы в клетках узелков (ростовая среда); (г) высокая активность щелочной фосфатазы в клетках узелков (остеогенная среда).

зованных коллагеновыми фибриллами плотно упакованных в пучки 1–2 уровней организации сухожильных нитей. В области стыка пучки имеют тонкие ответвления, которые вплетены в фибриллярный каркас (рис. 11б). Структурно-механическое значение данных конструкций очевидно. Инфильтрация – это достаточно примитивный (архаичный) механизм прикрепления. Гребневидная, веерообразно сплетенная конструкция позволяет равномерно распределить энергию натяжения на большую площадь зачатка энтезиса и, это явно более зрелый способ прикрепления. Взаимоотношение волокон в крепежных конструкциях не случайно, так как оно схоже с анатомической динамикой волокон Шарпье в фиброзных сухожильно-костных соединениях (Aaron et al., 2012). Формирова-

ние структур, скрепляющих разнородную ткань с перфорацией волокон в ранние сроки культивирования, свидетельствует о том, что энтезисы надкостничного типа можно отнести к одной из наиболее архаичных форм сухожильно-костных соединений. В формировании энтезоподобных структур имеют значение особенности минерализации, в частности, минеральный градиент, который возникает из-за внутренней шероховатости поверхности коллагеновых фибрилл, способствует осаждению, нуклеации и замедляет движение кальцийфосфатов, перемещаясь, по данным СЭМ, по направлению к границам раздела фаз. Описанные структуры схожи с “эмбриональными единицами” межфазных прикреплений, но, учитывая предельную незрелость, структуры можно отнести не более чем к предик-



**Рис. 11.** СЭМ-изображения энтезоподобных структур (остеогенная среда): (а) стрелки – ламелла, прикрепленная к коллагеновому каркасу посредством инфильтрации компактизированных отростков вглубь перитеноновой подложки; (б) стрелка – гребневидная структура в области стыка трабекулы с коллагеновым каркасом.

торам костно-сухожильных энтез (Zelzer et al., 2014). Принципиально важно, что в сегрегации, направленном росте, крепежных конструкциях и минерализации участвуют коллагеновые волокна, синтезированные *de novo*. Это значит, что морфогенетические истории протоэнтез в условиях *in vitro* определены: коллагеновый материал зарождающихся межфазных скреплений метаболически и топологически сенсibilизирован к восприятию механических импульсов и их градиентов. Среди метаболических факторов главные – это склераксис и Sox9 – хорошо известные индукторы энтез (Murchison et al., 2007; Blitz et al., 2009). Применительно к топологической сенсibilизации, речь идет об автономном и/или взаимообусловленном структурировании, увеличивающем жесткость подложки, – одного из ключевых факторов, запускающего трансформирующие процессы твердотельной направленности в клетках и экстрацеллюлярном матриксе.

## ОБСУЖДЕНИЕ

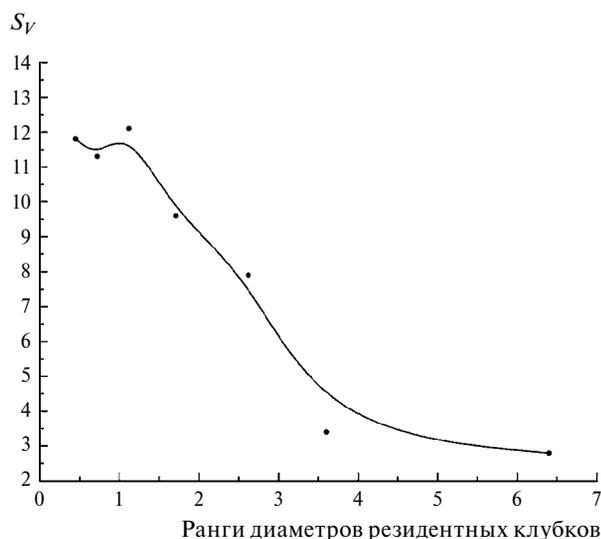
Вышеприведенные результаты свидетельствуют о том, что при культивировании *in vitro* совместно с МСК коллагеновый каркас перитеноновой подложки, будучи неоднородным по происхождению фибриллярного коллагена, тем не менее, реализует единый механизм структурно-молекулярных преобразований. Нет сомнений, что таковой определен самосборкой фибриллярного коллагена, осуществля-

емой: 1) в порядке ренатурации перитенонового геля, продолжающейся в подложке (для коллагена, привнесенного в подложку с гелем); 2) ассамблирования фибриллярного коллагена, синтезированного *de novo* МСК. Различное происхождение фибриллярного коллагена определяет вариации таких свойств, как чувствительность к действию морфогенетических сигналов, темпы формообразования, способность к удержанию в дифференцированном состоянии и главное – направленность структурообразующих трендов. Динамика формообразования, по крайней мере резидентных клубков, близка к обратной сигмоиде Гомперца, поскольку удельная площадь поверхности ( $S_v$ ) структур прямо пропорциональна энтропии, но обратна их упорядоченности. На рис. 12 приведена обратная сигмоида с отчетливо выраженными фазами задержки структурирования: стагнация показателя  $S_v$  в области малых размеров (размерные ранги 1, 2, 3, табл. 2, рис. 12) и ускоренного структурирования: снижение показателя  $S_v$  по мере роста размеров клубков (4-й, 5-й размерные ранги, табл. 2). Это коррелирует с динамикой фибриллогенеза коллагена и обосновывает единый механизм структурирования коллагеновых материалов (Zhu et al., 2018). Сигмоидальная динамика ( $S_v$ ), в свою очередь, свидетельствует о том, что отдельные формы в коллагеновых каркасах построены по механизму структурного насыщения и скачкообразного формообразования. Морфометрически упорядочивающимся областям свойственно локальное падение показателя  $S_v$ .

В относительно простых структурах (размером до 1 мкм) численные значения  $S_v$  не превышают 7% относительно соответствующих значений рядом расположенных участков каркаса (табл. 1, 2). Но на этом этапе важно не то, насколько форм много или мало, а то, что они разнотипны. Вовлечение в процессы структурирования нескольких типов зарождающихся форм свидетельствует о системности, а небольшой статистический размах колебаний  $S_v$  — о невысокой энергетичности. Это позволяет признать показатель  $S_v$  чувствительным маркером малых, но морфогенетически значимых структурных сдвигов, энергии которых может быть достаточно для пороговой морфологической индивидуации — фибриллярные протоузлы, конвергированные и компактные пластинки в пределах разрабатываемой классификации переходят в таксономически видимые.

Присутствие дифференцирующихся МСК — это фундаментальная предпосылка для микроэволюционных преобразований коллагенового каркаса. В целом, не известно, вероятны ли в условиях культур *in vitro* микроэволюционные процессы и насколько они релевантны с макроэволюцией. Нет понимания специфики микроэволюционной изменчивости и ее динамики: непрерывная и/или “урывками” (Hendry, Kinnison, 2001). Совместное с МСК культивирование коллагеновых каркасов призвано повысить

вероятность микроэволюционных событий, при изучении которых целесообразно учитывать некоторые предпосылки и методологические допущения. Основная предпосылка — малый масштаб (в пространстве и времени), приближающий разноразмерные уровни к рассмотрению сразу, а объект и окружающую среду наблюдать не раздельно, а вместе. Не менее важно и то, что культивирование осуществляют в средах с детерминированными колебаниями состава и свойств, которые претерпевают истощение и пополнение. В макросредах такого рода срабатывают механизмы эволюционного спасения, снижающие риски эволюционного “самоубийства” (Marrec, Bank, 2023). В микросредах и, в частности в структурирующемся каркасе, эволюционное спасение сублимировано в спасение морфогенетическое, сдерживающее распад и повышающее значимость структур. В итоге структуры фиксированы в дифференцированном состоянии, чему способствуют и скаффолды — “строительные леса”. В коллагеновых каркасах, культивируемых *in vitro*, эту опцию выполняют коллаген-цитоплазматические оплетки, иммобилизующие сфероиды и костные узелки, которые по мере созревания сбрасывают скаффолды. Понимание эволюции как развития, генерирующего и модулирующего структурные вариации (Willmore, 2012), в большей мере отражает процессы усложнения, протекающие в коллагеновом каркасе. С учетом этого коллагеновый каркас, возможно, представляет собой поле структурообразующих треков, сходящихся в аттракторах. По направлениям структурирования аттракторы плюрипотентны, морфологически не оформлены, эмерджентны — возникают внезапно и в разное время. Ключевой функционал — рецепция скачков сложности. В макроэволюции аттракторы мониторируют жизнеспособные потенциалы, осуществляя их захват (Ferriere, Legendre, 2013). В тканевых культурах *in vitro* аттракторы мониторируют центры структурирования, осуществляя захват того, что Вольперт (Wolpert, 2016) называет “позиционной информацией”. Точки роста сформированы упорядочивающимися областями, которые по выражению Шредингера экспортируют (минимизируют) структурную энтропию (Kauffman, 2020). В формате микро-макроэволюционных соотношений допустимо, что в ходе преобразований структуры экзаптируют, коллажируют и фуркатируют — инструментарий, углубляющий интерпретации эволюционного усложнения. Экзаптирующие структуры возникают путем



**Рис. 12.** Графическое изображение обратной сигмоиды Гомперца, отражающей взаимосвязь удельной площади поверхности ( $S_v$ ) и диаметров (приведенных в рангах) резидентных клубков при культивировании перитеноновой подложки совместно с МСК в течение 14 сут в ростовой среде.

прибавления к исходной функции дополнительных опций – “экзаптации сложения” (Arnold et al., 1994). По критерию морфологического сходства к таким структурам отнесены фибриллярные узлы и резидентные клубки. Исходная функция узлов – рецепция механических импульсов. Дополнительные опции (скорее вложение одной функции в другую) – изоляция структурных последствий механического напряжения и удаление отработанного материала. Экзаптируют и сфероиды: в ростовой среде они бесполезны как спандрелы (Gould, Lewontin, 1979; Durston, 2020). В остеогенной среде, насыщенной морфогенами, сфероиды активируют дополнительные опции, например, синтез гидроксиапатита. Коллаж – сборка надмолекулярных структур из присутствующего коллагена. Коллаж не предполагает молекулярную однородность собираемого материала, но допускает разделение (Gregory, 2008). В отдаленных окрестностях морфогенетических градиентов или, если материал слабо чувствительный к тканеспецифическим сигналам, повышена вероятность формирования разнородных сегрегатов. Так возникают конвергированные пластинки с минимальным набором переходных структур. В ближайших окрестностях морфогенетических градиентов детерминация усилена, а плюрипотентность аттракторов ограничена. Здесь для фибриллярного коллагена, прежде всего, синтезированного *de novo*, реализованы условия к объединению в тканеподобные образования. Таковы концентрические пластинки, у которых число переходных структур еще меньше, но таксономически они более оформлены. Таким образом, при коллажировании происходит построение форм, склонных к фуркатированию, морфогенетическая судьба которых зависит от особенностей позиционного информирования, захватывающего паттерны субпорогового уровня морфологической индивидуации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коллагеновый каркас, полученный из перитенонового геля, подвержен структурированию с формированием гистонеспецифических пластинчатых и клубковых образований. Этот процесс организует коллагеновый материал, синтезированный в дифференцированных клетках при совместном культивировании и встраивающийся в подложку. Формирование типовых структур коллагенового каркаса в пространстве происходит в очагах механического напряже-

ния, а в динамике культивирования – в соответствии с механобиологическими трендами эволюции соединительной ткани. Организация коллагенового каркаса протекает по следующим направлениям: а) повышение механосенситивности – рост связности фибриллярных узлов, формирование конвергированных пластинчатых образований; б) увеличение прочности – формирование компакт-пластинок; в) оптимизация охвата коллагеновой сети – формирование резидентных клубковых образований; г) канализация гидродинамических потоков – формирование концентрических пластинчатых образований. Проникшие из перитенонового геля в культуральную коллагеновую подложку сесамовидные сфероиды стимулируют структурирование кальцийфосфатов по механизмам гомо- и гетерогенной нуклеации, что эксклюзивно отражает остеогенез на стадиях организации его надмолекулярных структур.

МСК костного мозга при культивировании на подложке, полученной из перитенонового геля, проявляют тканеспецифическую активность по морфогенетическим векторам фибро-, тендо-, лигаменто- и остеогенной дифференцировки. Фиброгенный вектор направлен на обеспечение коллагеновым материалом эволюционно выработанных механических свойств опорной ткани. Фиброгенный вектор реализован путем синтеза фибриллярного коллагена и стимулирования процессов его структурирования в составе подложки. Теногенный вектор направлен на формирование сухожилий эмбрионального типа. Специфическим механизмом теногенной дифференцировки считают латеральную самосборку коллагеновых субфибрилл на наружных боковых поверхностях клеток и их автономизация в виде зачатков сухожильных нитей. Типовой структурой лигаментоподобных зачатков стали коллагеновые полосы, запутанные в клубки, ассоциированные с эластическими волокнами. Остеогенный вектор направлен на формирование ламеллярных, трабекулоподобных и узелковых остеоидных структур. Остеогенный вектор опосредован механизмом внутримембранозной оксификации, сопровождающейся внутри- и внеклеточной самосборкой коллагеновых массивов, экструзии, гаверсификации и фронтальной минерализации. Морфологический стартап энтезоподобных образований – это формирование веерообразных волокнистых комиссур между разнофазными компонентами: минерализованными спиколоподобными цитоплазматическими отростками между остеоци-

топодобными клетками, минерализованными остеонидными ламеллами, трабекулами и коллагеновыми волокнами каркаса. Основным механизмом прикрепления зарождающихся энтезис с каркасом служат дигитации в составе гребешковых структур.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. Ю.А. Нашекиной за организацию и проведение работ по получению коллагенового геля, а также старшему научному сотруднику Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе РАН, к.ф.-м.н. А.В. Нашекину за содействие в проведении электронной микроскопии на микроскопе JSM-7001F (Jeol, Япония). Особая благодарность доктору философских наук О.Н. Гайдаш за глубокое и полезное обсуждение проблем эволюционной биологии.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований “Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия” по заданию 2.1.04.7 на 2021–2025 гг. (ИОНХ НАН Б, НИИ ФХП БГУ, Институт физиологии НАН Б), Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FMFU-2021-0008 (ИНЦ РАН).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интереса.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено с использованием биологического материала, полученного от лабораторных крыс Вистар, выращенных в питомнике “Рапполово” (Санкт-Петербург, Россия), где животных содержали, подвергали эвтаназии и утилизировали в соответствии с требованиями “Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании” от 24.07.2000 № 554 (постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 27.10.2020 № 32 “Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 2.3/2.4.3590-20”). Протоколы экспериментов утверждены этическим комитетом Института физиологии НАН Беларуси и соответствуют нормативным документам Республики Беларусь (Нац. реестр правовых актов Республики Беларусь. 2012. № 8/25189).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.

Гайдаш А.А., Крутько В.К., Блинова М.И. и др. Структура и физико-химические свойства паравертбральных сухожилий // Цитология. 2022. Т. 64 (3). С. 249–261.

Кухарева Л.В., Парамонова Б.А., Шамолина И.И., Семенова Е.Г. Способ получения коллагена для лечения патологий тканей организма. Патент РФ № 2214827, 15.03.2002; опубл. 27.10.2003 г., бюл. № 30.

Aaron J.E. Periosteal Sharpey’s fibers: a novel bone matrix regulatory system? // Front. Endocrinol. 2012. V. 3. P. 98 (1–10).

Amizuka N., Hasegawa T., Yamamoto T., Oda K. Microscopic aspects on biomineralization in bone // Clin. Calcium. 2014. V. 24 (2). P. 203–214.

Arnold E.N. Investigating the origins of performance advantage: adaptation, exaptation and lineage effects // Phylogenetics and ecology. London: Academic Press, 1994. P. 123–168.

Bayer M.L., Yeung Ch.C., Kadler K.E. et al. The initiation of embryonic-like collagen fibrillogenesis by adult human tendon fibroblasts when cultured under tension // Biomaterials. 2010. V. 31. P. 4889–4897.

Beningo K.A., Dembo M., Wang Y.L. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors // PNAS USA. 2004. V. 101 (52). P. 18024–18029.

Benjamin M., Ralphs J.R. The cell and biology of tendons and ligaments // Int. Rev. Cytol. 2000. V. 196. P. 85–130.

Benjamin M., Ralphs J.R. Enteses – the bony attachments of tendons and ligaments // Ital. J. Anat. Embryol. 2001. V. 106. P. 151–157.

Benjamin M., Kumai T., Milz S., Boszczyk B.M. The skeletal attachment of tendons – tendon enteses // Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 2002. V. 133 (4). P. 931–945.

Blitz E., Viukov S., Sharir A. et al. Bone ridge patterning during musculoskeletal assembly is mediated through SCX regulation of Bmp4 at the tendon-skeleton junction // Dev. Cell. 2009. V. 17 (6). P. 861–873.

Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution // J. Biol. Chem. 1976. V. 251 (19). P. 6062–6067.

Djabourov M., Lechaire J.P., Gaill F. Structure and rheology of gelatin and collagen gels // Biorheology. 1993. V. 30 (3–4). P. 191–205.

Durston A.J. A Tribute to Lewis Wolpert and his ideas on the 50th anniversary of the publication of his paper ‘Positional information and the spatial pattern of differentiation’. Evidence for a timing mechanism for setting up the vertebrate anterior-posterior (A-P) axis // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21 (7). P. 2552.

- Eren A.D., Vasilevich A., Eren E.D. et al.* Tendon-derived biomimetic surface topographies induce phenotypic maintenance of tenocytes *in vitro* // *Tiss. Eng. Part A*. 2021. V. 27 (15–16). P. 1023–1036.
- Ferriere R., Legendre S.* Eco-evolutionary feedbacks, adaptive dynamics and evolutionary rescue theory // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2013. V. 368 (1610). P. 20120081.
- Franchi M., Trirè A., Quaranta M. et al.* Collagen structure of tendon relates to function // *Sci. World J.* 2007. V. 7. P. 404–420.
- Genin G.M., Kent A., Birman V. et al.* Functional grading of mineral and collagen in the attachment of tendon to bone // *Biophys. J.* 2009. V. 97 (4). P. 976–985.
- Ghita A., Pascut F.C., Sottileb V., Notingher I.* Monitoring the mineralisation of bone nodules *in vitro* by space- and time-resolved Raman micro-spectroscopy // *Analyst*. 2014. V. 139 (1). P. 55–58.
- Golub E.E., Boesze-Battaglia K.* The role of alkaline phosphatase in mineralization // *Curr. Opin. Orthop.* 2007. V. 18 (5). P. 444–448.
- Gould S.J., Lewontin R.C.* The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1979. V. 205. P. 581–598.
- Gregory T.R.* Evolutionary trends // *Evo. Edu. Outreach*. 2008. V. 1. P. 259–273.
- Grinnell F., Ho C.H., Tamariz E. et al.* Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices // *Mol. Biol. Cell*. 2003. V. 14. P. 384–395.
- Gundersen H.J., Bendtsen T.F., Korbo L. et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis // *APMIS*. 1988. V. 96 (5). P. 379–394.
- Hadate S., Takahashi N., Kametani K. et al.* Ultrastructural study of the three-dimensional tenocyte network in newly hatched chick Achilles tendons using serial block face-scanning electron microscopy // *J. Vet. Med. Sci.* 2020. V. 82 (7). P. 948–954.
- Hendry A.P., Kinnison M.T.* An introduction to microevolution: rate, pattern, process // *Genetica*. 2001. V. 112–113. P. 1–8.
- Heybeli N., Kömür B., Yılmaz B., Olcay G.* Tendons and ligaments // *Musculoskeletal Research and Basic Sci.* 2016. P. 465–482.
- Hongmei J., Grinnell F.* Cell-matrix entanglement and mechanical anchorage of fibroblasts in three-dimensional collagen matrices // *Mol. Biol. Cell*. 2005. V. 16 (11). P. 5070–5076.
- Ingraham J.M., Hauck R.M., Ehrlich H.P.* Is the tendon embryogenesis process resurrected during tendon healing? // *Plast. Reconstr. Surgery*. 2003. V. 112. (3). P. 844–854.
- Iwayama T., Bhongsatiern P., Takedachi M., Murakami S.* Matrix vesicle-mediated mineralization and potential applications // *J. Dental Res*. 2022. V. 101 (13). P. 1554–1562.
- Kaufman S.* Answering Schrödinger's question What is life? // *J. Entropy*. 2020. V. 22 (8). P. 815.
- Langevin H.M., Bouffard N.A., Badger G.J. et al.* Dynamic fibroblast cytoskeletal response to subcutaneous tissue stretch *ex vivo* and *in vivo* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2005. V. 288. P. 747–756.
- Li Y., Asadi A., Monroe M.R., Douglas E.P.* pH effects on collagen fibrillogenesis *in vitro*: electrostatic interactions and phosphate binding // *Mater. Sci. Engin. C*. 2009. V. 29 (5). P. 1643–1649.
- Marrec L., Bank C.* Evolutionary rescue in a fluctuating environment: periodic *versus* quasi-periodic environmental changes // *Proc. Biol. Sci.* 2023. V. 290 (1999). P. 20230770.
- Mienaltowski M.J., Adams S.M., Birk D.E.* Tendon proper and peritenon-derived progenitor cells have unique tenogenic properties // *Stem. Cell. Res. Ther.* 2014. V. 5 (4). P. 86 (1–15).
- Murchison N.D., Price B.A., Conner D.A. et al.* Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons // *Development*. 2007. V. 134 (14). P. 2697–2708.
- Peritenon // Merriam-Webster.com Medical Dictionary, Merriam-Webster, <https://www.merriam-webster.com/medical/peritenon>. Accessed 27 Jan. 2024.
- Ronsin O., Caroli C., Baumberger T.* Preferential hydration fully controls the renaturation dynamics of collagen in water-glycerol solvents // *Eur. Phys. J.* 2017. V. 40. P. 55 (1–5).
- Rossetti L., Kuntz L.A., Kunold E. et al.* The microstructure and micromechanics of the tendon-bone insertion // *Nat. Mater.* 2017. V. 16 (6). P. 664–670.
- Schweitzer R., Chyung J.H., Murtaugh L.C. et al.* Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments // *Development*. 2001. V. 128 (19). P. 3855–3866.
- Summers A.P., Koob T.J.* The evolution of tendon – morphology and material properties // *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 2002. V. 133 (4). P. 1159–1170.
- te Nijenhuis K.* Investigation into the ageing process in gels of gelatin/water systems by the measurement of their dynamic moduli // *Coll. Polymer Sci.* 1981. V. 259. P. 522–535.
- Tosh S.M., Marangoni A.G., Hallett F.R., Britt I.J.* Aging dynamics in gelatin gel microstructure // *Food Hydrocoll.* 2003. V. 17 (4). P. 503–513.
- Tresoldi I., Oliva F., Benvenuto M. et al.* Tendon's ultrastructure // *Muscl. Ligamen. Tendons J.* 2013. V. 3 (1). P. 2–6.

- Wang K., Ren Y., Lin S. et al. Osteocytes but not osteoblasts directly build mineralized bone structures // *Int. J. Biol. Sci.* 2021. V. 17 (10). P. 2430–2448.
- Willmore K.E. An introduction to evolutionary developmental biology // *Evo. Edu. Outreach.* 2012. V. 5. P. 181–183.
- Wilson S.L., Guilbert M., Sulé-Suso J. et al. A microscopic and macroscopic study of aging collagen on its molecular structure, mechanical properties, and cellular response // *FASEB J.* 2014. V. 28. P. 14–25.
- Wolpert L. Positional information and pattern formation // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2016. V. 117. P. 597–608.
- Zelzer E., Blitz E., Killian M.L., Thomopoulos S. Tendon-to-bone attachment: from development to maturity // *Birth. Defect. Res. (Part C).* 2014. V. 102 (1). P. 101–112.
- Zhu S., Yuan Q., Yin T. et al. Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications // *J. Mater. Chem. B.* 2018. V. 6. P. 2650–2676.

## Structure and Morphogenetic Properties of Collagen Matrixes Obtained from Connective Tissue Sheaths of Paravertebral Tendons

A. A. Gaidash<sup>a</sup>, \*, A. I. Kulak<sup>a</sup>, V. K. Krut'ko<sup>a</sup>, M. I. Blinova<sup>b</sup>,  
O. N. Musskaya<sup>a</sup>, S. A. Aleksandrova<sup>b</sup>, K. V. Skrotskaya<sup>b</sup>, V. A. Kulchitsky<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Institute of General and Inorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

<sup>b</sup>*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>c</sup>*Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk, Belarus*

<sup>d</sup>*Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

\*e-mail: algaidashspb@gmail.com

The morphogenetic properties of a collagen gel prepared by acetic acid extraction from the tendon sheaths (peritenons) of the paravertebral tendons of Wistar rats were studied. The gel was used as a substrate during *in vitro* cultivation together with mesenchymal stromal cells for 14 days in the growth and osteogenic incubation media. It has been established that the collagen framework of the peritenon substrate is strengthened by increasing the connectivity of fibrillar nodes and is structured with the formation of lamellar and tangle formations. Sesamoid globules, penetrating into the substrate from the initial peritenon gel, during cultivation remain inert in the growth medium, but exhibit an increased ability to structure calcium phosphates in the osteogenic medium. The formation of cell-mediated structures occurs by directions of fibro-, tendo-, ligament- and osteogenic differentiation. The fibrogenic direction provides a structuring framework; the tenogenic direction – the formation of embryonic tendons according to the mechanism of lateral assembly of collagen subfibrils on cell surfaces and their autonomization in the form of tendon filament primordia; the ligamentogenic direction – structuring of collagen ribbons associated with tangles and elastic fibers; the osteogenic direction – the formation of lamellar, trabecular and nodular osteoid structures through intramembranous ossification, accompanied by activation of alkaline phosphatase and mineralization. The formation of enthesis predictors is the organization of commissures between mechanically different-phase components of osteoid structures and frame. A classification of taxonomic forms has been developed and a hypothesis has been proposed about the role of evolutionary tools in the structuring of the collagen framework in tissue cultures *in vitro*. The classification of taxonomic forms has been developed and a hypothesis has been proposed about the role of evolutionary tools in the structuring of the collagen framework in tissue cultures *in vitro*.

**Keywords:** peritenon, scanning electron microscopy, fibrillar collagen, collagen gel, structuring of the collagen framework, histogenesis, calcium phosphates, classification, microevolution