

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Балтийский федеральный университет имени
Иммануила Канта»

На правах рукописи

Иванов Павел Александрович

**ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ/СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ IN VITRO
МОДЕЛИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ "РЕГЕНЕРИРУЮЩАЯ
КОСТЬ/КРОВЕТВОРНОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ"**

1.5.5. Физиология человека и животных

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Л.С Литвинова

Калининград - 2021

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Костная ткань	15
1.1.1. Развитие кости в онтогенезе	16
1.2. Природа ниши стволовых клеток	20
1.2.1. Специализированные ниши костного мозга	21
1.3. Молекулярные сигналы ниши ГСК	25
1.4. Роль воспаления в заживлении повреждений костной ткани	28
1.5. Взаимосвязь процессов воспаления и ангиогенеза при заживлении костной ткани	30
1.6. Репаративная регенерация костной ткани	32
1.6.1. Аутологичные костные трансплантаты	32
1.6.2. Аллогенные костные трансплантаты	33
1.6.3. Искусственные заменители костного трансплантата	34
1.7. Свойства поверхностей трехмерных скаффолдов, используемых в регенеративной медицине	34
1.7.1. Особенности топографии поверхности искусственных скаффолдов – прототипов костной ткани	37
1.7.2. Биосовместимость кальцийфосфатного покрытия, используемого в регенеративной медицине	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	40
2.1. Объект и материал исследования	40
2.2. Получение культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток из липоасpirата жировой ткани	40
2.2.1. Подсчет общего числа клеток в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека	41
2.2.2. Проведение дифференцировочной и фенотипической идентификации первичной культуры клеток человека (из липоасpirата жировой ткани) для определения ее принадлежности к пулу мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток	42
2.2.3. Оценка жизнеспособности культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека	42
2.2.4. Детекция дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека методом цитологического дифференциального окрашивания	43
2.2.5. Идентификация фенотипических характеристик культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека методом проточной цитометрии	46
2.3. Экспериментальное 2D и 3D культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека	48
2.3.1. Характеристика искусственных матриц с кальцийфосфатным	49

покрытием, имитирующих регенерирующую костную ткань	
2.4. Определение относительного уровня экспрессии мРНК гена <i>ALPL</i> методом полимеразной цепной реакции	51
2.5. Определение концентрации гемопоэтических факторов, медиаторов с про- и противовоспалительной, проапоптотической и хемокиновой активностью, методом проточной флуориметрии	53
2.6. Оценка концентрации остеокальцина в супернатантах клеточных культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека (на 21 сутки культивирования) методом иммуноферментного анализа	55
2.7. Определение общей площади трёхмерных островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) и числа клеток с морфологией кроветворных в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека методом компьютерной морфометрии	56
2.8. Методы статистического анализа данных	59

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ **61**

3.1. Оценка числа живых и мёртвых форм мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования (14 дней) с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (<i>срок культивирования - 14 дней</i>)	61
3.2. Оценка фенотипических параметров в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (<i>срок культивирования - 14 дней</i>)	62
3.3. Исследование концентрации цитокинов в супернатантах культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (<i>срок культивирования - 14 дней</i>)	64
3.4. Оценка относительной экспрессии мРНК гена щелочной фосфатазы (<i>ALPL</i>) в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (<i>срок культивирования - 14 дней</i>)	67
3.5. Исследование концентрации остеокальцина в супернатантах культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (<i>срок культивирования - 21 день</i>)	69
3.6. Оценка общей площади островков/узелков минерализации (при окраске	70

ализариновым красным) в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток в условиях их дистантного сокультивирования с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (<i>срок культивирования - 21 день</i>)	
3.7. Оценка числа клеток с морфологией кроветворных в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (<i>срок культивирования - 21 день</i>)	72
3.8. Корреляционные взаимосвязи, выявляемые между исследуемыми параметрами	73
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	95

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2D (от англ. 2-dimensional) – двумерная культура

3D (от англ. 3-dimensional) – трехмерная культура

КФ – кальцийфосфатный

мРНК – матричная РНК

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные/стволовые клетки

ППС – полная питательная сред

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

ALPL – (от англ. alkaline phosphatase) – щелочная фосфатаза

IL – (от англ. interleukin) – интерлейкин

IFN – (от англ. interferons) – интерферон

IP-10 – (от англ. interferon γ -induced protein 10 kDa) – интерферон гамма индуцируемый белок 10

LIF – (от англ. leukemia inhibitory factor) – лейкемия-ингибирующий фактор

CaP – (от англ. calcium phosphate) – кальцийфосфатный

CD – (англ. cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

G-CSF – (от англ. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

RANTES – (от англ. regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) – молекула регуляции активации экспрессии и секреции нормальных Т-клеток

SCF – (от англ. stem cell factor) – фактор стволовых клеток

TNF – (от англ. tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

TLR – (от англ. toll-like receptor) – толл-подобный рецептор

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Мультипотентные мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (ММСК) человека представляют собой популяцию фибробластоподобных клеток, экспрессирующих специфические поверхностные маркеры и характеризующихся способностью к самоподдержанию популяции [El-Kehdy H. et al., 2020]. ММСК обладают потенциалом дифференцировки *in vivo* в ортодоксальных направлениях (в фибробласты, остеобласты, адипоциты, хондробласты, теноциты, клетки гемопозиндуцирующего микроокружения), которые определяются, во многом, источником получения клеток и свойствами микроокружения [Lin C.-S. et al., 2013; El-Kehdy H. et al., 2020]. Так, ММСК, происходящие из костного мозга (ММСК-КМ), в некотором роде архетипичны [Gu Y. et al., 2016; Li Y. et al., 2017] и дифференцируются, преимущественно, в остеогенном направлении [Ardeshiryajimi A. et al., 2015; Wechsler M.E. et al., 2016; Xu L. et al., 2017], тогда как для ММСК из жировой ткани (ЖТ) более характерна дифференцировка в ангиогенном, чем в остеогенном направлении [Brennan M.A. et al., 2017]. Однако, в других исследованиях было установлено, что остеогенная дифференцировка ММСК-ЖТ *in vitro* превосходит таковую для ММСК-КМ, с точки зрения отложения кальция в экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ) и экспрессии генов остеогенной дифференцировки [Heo J.S. et al., 2016; Rath S.N. et al., 2016; Brennan M.A. et al., 2017]. По мнению ряда авторов, ММСК-ЖТ имеют некоторые преимущества перед ММСК-КМ, включая большее количество предшественников из аналогичного объема, полученного биообразца и повышенную способность к пролиферации, дифференцировке и ангиогенезу *in vivo* [Kim Y.J. et al., 2007; Barba M. et al., 2013; Dufrane D., 2017]. Известно, что применение ММСК-ЖТ после ишемии конечности [Moon M.H. et al., 2006; Gimble J.M. et al., 2007; Kondo K. et al., 2009] и инфаркта миокарда [Miyahara Y. et al., 2006; Madonna R., De Caterina R., 2010] способствовало увеличению количества сосудов и восстановлению кровотока в поврежденных тканях. Кроме того, введение ММСК-ЖТ или кондиционированной среды приводило к неоваскуляризации печени, обеспечивая ее эффективную регенерацию [Nahar S. et al., 2018]. Процесс физиологической и, в большей степени, репаративной (после переломов)

регенерации костной ткани, по сути, эволюционно протекает как формирование костей в эмбриогенезе, т.е. с обязательным привлечением стволовых клеток [Ratushnyy A. et al., 2017; Mussano F. et al., 2017]. В связи с вышесказанным, контроль жизнедеятельности ММСК, формирующих строму различных органов и тканей человека и животных, а также "паренхимы" костной ткани, посредством формирования регулируемого трехмерного матрикса, представляется одним из перспективных направлений *современной иммунофизиологии*. Известно, что особенности природного или искусственного внеклеточного матрикса (скаффолда) способны регулировать направление дифференцировки и созревания ММСК [Kolf et al., 2007]. При этом обеспечение результативной кооперации между матриксом/каркасом, клетками и сигнальными молекулами (цитокины, факторы роста и др.) при использовании технологии скаффолдов, определяется межфазной границей раздела: искусственный материал / клетки и ткани [Tornetta III P. et al., 2019; Lim S. et al. 2021].

Степень разработанности темы. Современные фундаментальные исследования убедительно доказывают, что гемопоэтические очаги возникают в тесной связи с костной и хрящевой тканями [Dellatore S.M. et al., 2008; Assis-Ribas T. et al., 2018]. Важная роль ММСК, как компонента гемопоэзиндуцирующего микроокружения (ГИМ), состоит в обеспечении выживаемости гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), поддержании их в состоянии покоя или дифференцировки, репарации тканевых повреждений, за счёт секреции факторов роста, межклеточного взаимодействия и продукции матричных структурных белков [Han J.-Y. et al., 2007; Khlusov I.A. et al., 2018; Chapman J., Zhang Y., 2020]. Критическими компонентами и регуляторами кроветворной ниши являются остеобласты, которые обеспечивают поддержание покоящейся популяции примитивных ГСК в костном мозге [Zhang J. et al., 2003]. В то же время, из ГСК формируются остеокласты, которые являются важнейшими компонентами физиологического процесса костного ремоделирования в фазу резорбции [Zaidi M., 2007]. Жизнедеятельность ММСК, их самообновление и дифференцировка строго контролируются различными ауто- и паракринными механизмами и

инструктивными сигналами (цитокины, факторы роста и др.), а также внешними факторами (в том числе, ионами кальция) [Bonfini A., 2015]. Изменение или нарушение этой регуляции приводит к патологическим последствиям, в частности, таким, как остеопороз или фенотип с высокой костной массой [Grassel S., Ahmed N., 2007; Song I. et al., 2011]. В связи с этим, интерес представляет оценка паракринного потенциала ММСК, как одного из определяющих условий (наряду с межклеточными контактами) для выявления их способности взаимодействовать с кроветворными клетками. Так, ММСК являются источником разнообразных цитокинов и трофических факторов (в частности, IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF, остеопонтин, TIMP-2 и др.), однако тип и уровень секреции факторов варьируется в зависимости от тканевого источника [Park C.W. et al., 2009]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что специфическое тканевое микроокружение (ниша) ММСК контролирует их секреторную активность. Для развития гемопоэза важнейшим физиологическим микроокружением ММСК является кость. Активно обсуждаются вопросы о роли ММСК в создании специфического микроокружения (ниш) гемопоэтических клеток. Однако, значение про- и противовоспалительных и иммуномодуляторных биомолекул, синтезируемых ММСК, ключевых для закладки ниш гемопоэтических стволовых клеток [He N. et al., 2014; Gibon E. et al., 2016; Nojo H. et al., 2017], для реализации разных этапов кроветворения, остеогенеза/остеолизиса и ремоделирования кости, остаётся дискуссионным. Таким образом, направленное изучение компонентов микроокружения ММСК и их роли в регуляции гемопоэза, является перспективным и актуальным в контексте изучения фундаментальных механизмов биологии/физиологии и регуляции стволовых клеток, а также для эффективного развития тканевой инженерии и регенеративной медицины, в целом.

В связи с вышесказанным, **целью** настоящего исследования явилась оценка роли мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани, дифференцирующихся в остеобласты в трехмерной модели дистантного культивирования *in vitro*, в формировании клеточных и гуморальных факторов гемопоэз-индуцирующего микроокружения (ГИМ).

Задачи исследования:

1. Экспериментальное моделирование процессов регенерации системы "кость/костный мозг" в условиях дистантного трехмерного культивирования *in vitro* мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека и скаффолда с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральный матрикс костной ткани.
2. Определить взаимосвязь секретируемых ММСК-ЖТ гуморальных факторов/медиаторов с клетками, экспрессирующими кроветворные маркеры, в условиях *дистантного* сокультивирования культуры клеток с трёхмерным скаффолдом с кальцийфосфатным покрытием.
3. Выявить взаимосвязь остеодифференцировки ММСК-ЖТ с морфологическим созреванием кроветворных клеток в условиях *дистантного* влияния трёхмерного скаффолда с кальцийфосфатным покрытием.
4. Оценить клеточные и гуморальные регуляторные механизмы остеогенеза и гемопоэза, в условиях *дистантного in vitro* культивирования ММСК-ЖТ с трёхмерным скаффолдом с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральный матрикс костной ткани.

Положения, выносимые на защиту

1. Дистантное *in vitro* 14-дневное культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека с трёхмерным скаффолдом с кальцийфосфатным покрытием способствует их дифференцировке в остеобласты (снижение доли [CD73, CD90]⁺ клеток; рост экспрессии гена *ALPL*), что сопровождается повышением доли [CD45,34,14,20]⁺ клеток, коррелирующим с нарастанием в супернатантах концентрации гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF и хемокин RANTES) и снижением содержания молекул с провоспалительным (IL-6, IP-10, IFN γ и TNF α) и проапоптотическим (TRAIL) действием.
2. В 21-дневной культуре ММСК-ЖТ, контактирующих со скаффолдом, несущим кальцийфосфатное покрытие, прирост доли морфологически идентифицируемых кроветворных клеток коррелирует с увеличением

концентрации остеокальцина в среде культивирования и с растущей площадью островков/узелков минерализации (кальцификации) клеточной культуры на пластике, отражающей дифференцировку ММСК в остеобласты.

3. Присутствие скаффолда с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральное вещество костной ткани, моделирует состояние костномозговых лакун костной ткани и обуславливает способность культуры ММСК-ЖТ человека формировать *in vitro* прообраз системы "кость/костный мозг" посредством активной гуморальной и межклеточной кооперации в развитии минерализованного костного матрикса как тканевого элемента гемопоэзинуцирующего микроокружения.

Научная новизна

Новизна научного исследования определяется получением новых данных, касающихся выявления роли мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека в формировании системы "кость/костный мозг" в *in vitro* условиях, приближенных к физиологическим за счет моделирования структурно-функционального состояния костномозговой полости костей. Определены ключевые медиаторы, определяющие формирование ММСК минерализованного костного матрикса как тканевого элемента микроокружения для кроветворных клеток, что является перспективной стратегией для обеспечения жизнедеятельности и регулируемого масштабирования клеточных популяций из пула стволовых клеток. Выявлено, что ММСК-ЖТ человека способны дифференцироваться в остеобласты, продуцирующие *in vitro* минерализованный костный матрикс, что приводит к снижению экспрессии маркеров ММСК [CD90, CD73]⁺ и росту (в 2,8 раза) доли клеток с фенотипом гемопоэтических [CD45,34,14,20]⁺, в условиях дистантного *in vitro* культивирования с трёхмерным скаффолдом с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральный матрикс костной ткани. Приоритетными являются данные, свидетельствующие, что увеличение доли клеток [CD45,34,14,20]⁺ в 14-дневной культуре ММСК-ЖТ, в условиях дистантного *in vitro* сокультивирования с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием, происходит на фоне

снижения концентрации факторов с провоспалительным (IL-6, IP-10, IFNg и TNFa) и проапоптотическим (TRAIL) действием и коррелирует с содержанием в среде культивирования хемокина RANTES и уровнем экспрессии мРНК гена щелочной фосфатазы (ALPL). В работе приведены убедительные данные о том, что основными молекулами, способствующими росту числа гемопоэтических клеток в трехмерной культуре ММСК-ЖТ в условиях 14-дневного сокультивирования, являются LIF, SCF и G-CSF. Впервые выявлена корреляция между увеличением площади минерализованного костного матрикса в 21-дневной трехмерной культуре ММСК с ростом концентрации остеокальцина в среде культивирования и увеличением плотности распределения в культуре морфологически идентифицируемых кроветворных клеток. Приоритетными являются данные о том, что развитие минерализованного костного матрикса как тканевого элемента гемопоэиндуцирующего микроокружения отражает способность культуры ММСК жировой ткани человека формировать прообраз системы "кость/костный мозг" при дистантном *in vitro* контакте со скаффолдом, несущим кальцийфосфатное покрытие.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты имеют, прежде всего, фундаментальный характер и раскрывают новые морфофункциональные аспекты способности мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека формировать минерализованный костный матрикс как тканевый элемент кроветворного микроокружения. Это может иметь значение для дальнейшего развития экспериментального *in vitro* изучения физиологической регенерации системы "кость/костный мозг" за счет моделирования структурно-функционального состояния костномозговой полости костей. *Практическая значимость* исследования обусловлена тем, что разработанная система является перспективной стратегией для обеспечения регулируемой дифференцировки и масштабирования кроветворной и остеогенной популяций для персонализированных решений в области тканевой биоинженерии и регенеративной биомедицины. Кроме того, полученные результаты имеют

значение для дизайна имплантатов с оптимальной поверхностью в персонифицированной реконструкции системы "кость/костный мозг" в травматологии и ортопедии, дентальной имплантологии, челюстно-лицевой хирургии, пластической хирургии, на основе *in vitro* определения морфофункциональной реакции ММСК-ЖТ каждого конкретного индивида. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе в медицинском институте и Институте Живых Систем БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

Методология и методы диссертационного исследования

В соответствии с поставленными задачами выбраны высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе современного высокотехнологического Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта (г. Калининград). В качестве материала исследования использовали культуру мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток, полученных из жировой ткани человека (ММСК-ЖТ), сокультивируемых с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием (КФ).

Основные методы исследования:

1. Выделение ММСК из жировой ткани условно здорового донора.
2. Культуральные методы исследования *in vitro*.
3. Оценка уровня экспрессии гена *ALPL* (щелочной фосфатазы) с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).
4. Оценка фенотипических характеристик культуры ММСК-ЖТ, методом проточной цитометрии.
5. Исследование дифференцировки ММСК-ЖТ, методом дифференциального цитологического окрашивания
6. Оценка содержания факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в супернатантах клеточных культур ММСК-ЖТ методом проточной флуориметрии.

7. Оценка концентрации остеокальцина в супернатантах клеточных культур ММСК-ЖТ методом иммуноферментного анализа (ИФА).
8. Определение общей площади трёхмерных островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) и числа клеток с морфологией кроветворных в культурах ММСК-ЖТ методом компьютерной морфометрии.
9. Статистический анализ данных.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов основывается достаточным объёмом экспериментального материала, использованием современных высокотехнологичных методов исследования (проточная цитофлуориметрия, культуральные методы, ПЦР, ИФА, оптическая микроскопия, компьютерная морфометрия) и современного оборудования, а также адекватного выбора критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на VIII Международной конференции по химии и физикохимии олигомеров (г. Нижний Новгород, 2019), Пятой научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология для практикующих врачей» (29 сентября - 5 октября 2019 г., Сочи), IV Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва, 2019), Шестой научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (г. Сочи, 2020), XVI Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (г. Челябинск, 2021).

Работа осуществлена при финансовой поддержке Российского научного фонда (16-15-10031), Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ (НШ-2495.2020.7) и Государственного задания (№ FZWM-2020-0010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 7 полнотекстовых статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях,

определенных ВАК РФ, 5 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 8 таблицами. Библиографический указатель включает 254 источников (5 отечественных и 249 иностранных).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. КОСТНАЯ ТКАНЬ

Кости являются сложноорганизованными многокомпонентными [композитными] структурно-функциональными частями опорно-двигательной системы, которые выполняют и/или способствуют реализации разнообразных функций организма, включая регуляцию метаболизма и депонирование ключевых минеральных веществ, формирование скелета и перемещение тела в пространстве, защиту жизненно важных внутренних органов, кроветворение [Loi F. et al., 2016; Wang W., Yeung K.W.K., 2017].

Композитный матрикс кости состоит в основном из коллагена, который составляет приблизительно 10% от массы взрослой кости, и минерального [неорганического] вещества, состоящего, преимущественно, из гидроксиапатита и трикальцийфосфата [около 65% массы взрослой кости]. Вода составляет примерно 25% от массы костной ткани взрослого человека. Коллагеновые волокна придают кости эластичность и большую прочность на разрыв, в то время как фосфаты кальция способствуют ее высокой прочности на сжатие. Эти свойства обеспечивают уникальные свойства костной ткани как органоминерального композита [Merolli A., Santin M., 2009; Merolli A., Tranquilli L.P., 2010].

Однажды сформированная кость поддерживается в рабочем состоянии процессами моделирования и ремоделирования [Lieberman J.R., Friedlaender G.E., 2005; Wang W., Yeung K.W.K., 2017]. Моделирование новой кости происходит без предшествующей фазы резорбции, тогда как для процесса костного ремоделирования фаза резорбции необходима и формирование нового костного матрикса происходит после предварительной резорбции старой костной ткани [Merolli A., Santin M., 2009]. Моделирование костной ткани осуществляется преимущественно в период активного роста и влечет за собой изменение пропорций, формы и размера кости. Важно отметить, что процесс моделирования необходим и в зрелом возрасте, для адаптации к нагрузкам [Wang W., Yeung K.W.K., 2017].

Ремоделирование кости происходит благодаря скоординированному функционированию трех клеточных типов: остеокластов, которые разрушают старую кость; остеобластов, формирующих новую кость; остеоцитов, замурованных в костном матриксе, которые играют важную роль в метаболизме костного матрикса и паракринной передаче сигналов. Как регуляторы минерального обмена, остеоциты координируют активность остеобластов и остеокластов в ответ на механические раздражители [Bellido T., 2014]. Остеобласты, производные мезенхимных стволовых клеток (МСК), секретируют органический костный матрикс и способствуют его минерализации [Harada S., Rodan G.A., 2003]. Во время заключительной фазы ремоделирования кости остеобласты подвергаются апоптозу или внедряются в костный матрикс в качестве остеоцитов во время процесса кальцификации, опосредованного щелочной фосфатазой [Walsh M.C. et al., 2006; Marie P.J., Kassem M., 2011]. Остеокласты, клетки костномозгового происхождения, резорбируют костный матрикс путем кислотной декальцификации и протеолитического растворения [Boyle W.J. et al., 2003; Loi F. et al., 2016].

Ежегодно около 3% кортикальной кости и 25% губчатой кости претерпевают процесс физиологической регенерации [Wang W., Yeung K.W.K., 2017]. Относительное равновесие процессов остеолизиса/остеогенеза эффективно предупреждает механическое повреждение костной ткани [Doblaré M. et al., 2004].

1.1.1. Развитие кости в онтогенезе

Формирование скелетных элементов начинается с процесса клеточной конденсации, когда мезенхимные клетки мигрируют и пролиферируют по мере того, как они образуют межклеточные контакты посредством экспрессии молекул адгезии [Hall V.K., Miyake T., 2000]. Последующее развитие кости происходит через один из двух механизмов: эндохондральная оссификация (формирование шаблона хряща и его замена на костную ткань) или внутримембранозная оссификация (прямая дифференцировка ММСК в преостеобласты).

По типу внутримембранозной (также называемой «дермальной») оссификации развиваются главным образом плоские кости, в т.ч. кости черепа, лопатка и нижняя челюсть [Baron R., 2008]. Процесс не очень хорошо охарактеризован и до сих пор считается «исключением» для развития скелета, поскольку большинство костей формируется посредством эндохондрального окостенения [Kronenberg H.M., 2003]. Существуют четкие различия в составе и структуре костного матрикса, сформированного посредством эндохондрального и внутримембранозного окостенения. Тем не менее, недавний анализ выявил несколько общих молекулярных регуляторов данных процессов [Abzhanov A. et al., 2007].

Большинство костей, включая все длинные кости, формируются посредством эндохондрального окостенения. В этом процессе мезенхимная конденсация сопровождается направленной дифференцировкой клеток-предшественников в прехондроциты и хондроциты, чтобы создать хрящевой зачаток с надхрящницей на границе. В центре этой модели, где начинается первичная оссификация, хондроциты становятся гипертрофированными, минерализуют свой матрикс и способствуют хомингу хондрокластов и эндотелиальных клеток кровеносных сосудов через секрецию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Кровеносные сосуды облегчают приток кроветворных клеток, которые взаимодействуют со стромой и образуют будущий костный мозг в формирующихся лакунах. Клетки в перихондрии дифференцируются в остеобласты и секретируют матрицу, богатую коллагеном I типа, что приводит к образованию костного воротника [Kronenberg H.M., 2003]. Гипертрофированные хондроциты подвергаются апоптозу и замещаются остеобластами, которые образуют костный матрикс. Вторичные центры окостенения развиваются на концах модели хряща, где снова хондробласты прекращают пролиферацию, происходит врастание кровеносных сосудов и формирование остеобластов. Между первичным и вторичным центрами окостенения зона пролиферирующих хондробластов (известных как ростовая пластинка) позволяет удлинять кости. Расширение костей происходит за счет пролиферации и последующего внутримембранозного окостенения мезенхимных клеток на костной поверхности (аппозиционный рост).

Многие процессы, происходящие во время заживления переломов, повторяют события, происходящие во время образования длинных костей. Однако, во время физиологического формирования кости многие из этих процессов протекают одновременно, но с четким пространственным распределением, в то время как во время заживления перелома они четко разделены по времени и являются последовательными процессами.

За начальным воспалительным ответом следует анаболическая фаза [Fröhlich M. et al., 2008]. Хондроциты производят хрящ, который в конечном итоге распространяется по всему разрывному промежутку, соединяя концы сломанной кости через несколько недель после травмы. Наряду с сопутствующими фиброзными тканями эта хрящевая ткань, обычно известная как мягкий каллус, обеспечивает начальную механическую стабильность перелома и служит каркасом для формирования эндохондральной кости [Loi F. et al., 2016]. Сам хрящ является бессосудистым, а реваскуляризация сопровождается минерализацию матрикса. Кальцифицированный хрящ подвергается воздействию растущих кровеносных сосудов [Fröhlich M. et al., 2008].

В то же время, когда мягкий каллус развивается, в локальных областях, которые имеют лучшее кровоснабжение и большую механическую стабильность, через внутримембранный путь прогрессирует образование новой кости, поскольку мигрированные ММСК и периостальные остеопрогениторные клетки дифференцируются в остеобласты, которые непосредственно формируют костную ткань. Обычно это внутримембранное образование кости начинается во внутреннем слое надкостницы на некотором расстоянии от места повреждения, постепенно продвигаясь к разрывному промежутку [Malizos K.N., Papatheodorou L.K., 2005; Bielby R. et al., 2007; Claes L. et al., 2012]. В конечном итоге костная ткань покрывает внешнюю поверхность фиброхрящевого каллуса, обеспечивая дополнительную механическую стабильность и представляя первые этапы минерализации фиброхрящевого каркаса. Хондроциты при гипертрофии мягкого каллуса переходят в апоптоз, секретировав кальций и медиаторы, которые стимулируют вращение

сосудов, в конечном счете оставляя после себя частично кальцифицированный внеклеточный матрикс хряща [Gerstenfeld L.C. et al., 2003; Tsiridis E. et al., 2007]. Наблюдается обширное врастание сосудов в разрыв хряща, и, соответственно, усиление кровотока в месте заживающего перелома, на фоне остеодифференцировки ММСК в остеобласты и отложением костного матрикса на каркасе хряща [Gerstenfeld L.C. et al., 2003; Tsiridis E. et al., 2007]. Этот процесс называют стадией формирования твердого каллуса [Marsell R., Einhorn T.A., 2011; Claes L. et al., 2012; Loi F. et al., 2016].

По мере продвижения процесса минерализации хряща механическая стабильность места перелома увеличивается, в конечном итоге достигая достаточной устойчивости, чтобы независимо переносить физиологические нагрузки; обычно эта стадия достигается через несколько недель или месяцев после первичного повреждения [Harwood P.J. et al., 2010; Loi F. et al., 2016]. Хондрокласты рассасывают кальцифицированный хрящ, и остеобластные предшественники начинают процесс формирования новой кости, в котором механическая непрерывность коры восстанавливается путем последующей фазы ремоделирования [Fröhlich M. et al., 2008], в процессе которого в конечном итоге происходит восстановление типичной структуры остеона [Harwood P.J. et al., 2010; Claes L. et al., 2012; Loi F. et al., 2016]. Ремоделирование каллуса происходит через катаболические процессы. Каллус уменьшается в размерах, а остеобластические и остеокластические процессы чередуются, чтобы восстановить нормальную гематопозитическую и трабекулярную структуру, восстанавливая кость до ее поврежденного состояния [Einhorn T.A., Gerstenfeld L.C., 2015].

Этот процесс ремоделирования может занять несколько месяцев или даже лет, но в конечном итоге процесс восстанавливает нормальную форму и целостность кости, завершая процесс заживления перелома [Loi F. et al., 2016].

1.2. ПРИРОДА НИШИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Природа ниши стволовых клеток и особенности взаимодействия ниши с ММСК – ключевые вопросы биологии стволовых клеток [Terskikh V.V. et al., 2007]. Ниша должна быть свободной территорией и динамической структурой для координации поведения стволовых клеток во время гомеостаза и репарации [Bonfini A. et al., 2015]. Сигналы, полученные из ниши, также имеют решающее значение для включения специфических программ в ответ на стресс. Стресс в костном мозге может быть индуцирован кровотоком или потерей клеток, вызванной токсическими веществами, в том числе химиотерапевтическими агентами [Lander A.D. et al., 2012].

Для объяснения такого фундаментального и противоречивого явления как самоподдержание пула гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и последующего выбора их программы дифференциации в эту или иную линию клеток, Шофилд (1978) выдвинул гипотезу о гемопоэтической нише (специализированная микросреда для клетки) [Schofield R., 1978]. Статья Шофилда дала начало 30 годам исследований, посвященным гипотетическим моделям и различным аспектам функциональной ниши ГСК и их иерархии. Обнаружение тесных контактов между ГСК и остеобластами, расположенными в эндосте и адвентициальными клетками кровеносных сосудов, совершило научный прорыв в данной области, а существование остеобластных и сосудистых ниш для ГСК постулировано с 2003 года [Khlusov I.A. et al., 2018]. В свою очередь, углубления в костной матрице были задуманы как активные ниши для остеобластной дифференцировки и созревания ММСК. Таким образом, можно предположить существование структурно-функциональной иерархии ниш ММСК [Khlusov I.A. et al., 2018].

Исследователями сформированы разные определения ниш стволовых клеток, каждое из которых описывает разных характерологические особенности этих структур, например:

1) Li et al. (2005) рассматривают нишу стволовых клеток как группу клеток в специальном месте ткани для поддержания стволовых клеток. Общая структура ниши является переменной, и различные типы клеток обеспечивают среду ниши

[Li L., Xie T., 2005]. Он постулирует существование нишевой иерархии из-за гетерогенности ГСК в разных участках костного мозга.

2) Уилсон и Трумпп (Wilson and Trumpp, 2006) дают определение ниши в костном мозге как клеточной и молекулярной микросреды, которая регулирует функцию ГСК [Wilson A., Trumpp A., 2006].

3) «Ниша» состоит из клеточных компонентов микроокружения, а также сигналов, исходящих из опорных клеток. Такого мнения придерживается научное сообщество. Например, ниша представляет собой специфическое микроокружение и играет жизненно важную роль в регуляции активности стволовых клеток [Arai F., Suda T., 2008].

4) В органе ниша является ограниченной областью, которая поддерживает самообновление отделов стволовых клеток [Gentry S.N., Jackson T.L., 2013] и состоит из как локализованных сигнальных клеток, так и внеклеточной матрицы, что контролирует судьбу стволовых клеток [Simons B., Cleavers H., 2011].

5) Ниша - это высокоспециализированная сложная микросреда [Scadden D.T., 2007], которая физически локализует стволовые клетки и поддерживает их сущность/морфологию стволовых клеток [Scadden D.T., 2006].

1.2.1. Специализированные ниши костного мозга

В костном мозге были идентифицированы, по меньшей мере, 2 топографически различные ниши, поддерживающие ГСК: остеобластная (эндостальная) ниша и эндотелиальная (сосудистая). Остеобластическая ниша может обеспечить стабильную микросреду для поддержания ГСК. Напротив, сосудистая ниша облегчает трансэндотелиальную миграцию ГСК во время мобилизации и может способствовать распространению ГСК и дальнейшей дифференциации [Yin T., Li L., 2006]. Остеобластная и сосудистые ниши содержат различные типы клеток со специфическими регуляторными функциями [Zhang J. et al., 2003; Calvi L.M. et al., 2003; Kiel M.J. et al., 2005; Kopp H.G. et al., 2005; Konopleva M.Y., Jordan C.T., 2011].

Остеобластная ниша, локализованная на внутренней поверхности (эндосте) костной полости, на границе между трабекулярной костью и костным мозгом, находятся в непосредственном контакте с остеобластами [Toscani D. et al., 2015] и ММСК [Kolf С.М. et al., 2007; Khlusov I.A. et al., 2018], обеспечивает микроокружение для длительно репопулирующих гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и направлена на поддержание гомеостаза покоящихся (молчащих – quiescent) медленно делящихся клеток [Tasian S.K. et al., 2018].

Остеобласты - основные костно-формирующие клетки – являются критическими компонентами и регуляторами ниши ГСК; они позволяют поддерживать покоящуюся популяцию примитивных ГСК в костном мозге [Zhang J. et al., 2003]. Самообновление и дифференцировка ГСК в остеобластной нише контролируются различными сигналами, включая многие цитокины и хемокины, в том числе хемокиновый лиганд CXCL12 (CXCL12), ангиопоэтин-1 и остеопонтин, а также ионы кальция, кислородное напряжение и реактивные формы кислорода (ROS) [Wang L.D., Wagers A.J., 2011].

Во время ремоделирования костной ткани *in vivo*, стромальные предшественники колонизируют чашевидные углубления глубиной до 40 мкм в трабекулярной кости, образованные остеокластами, и дифференцируются в остеобласты, активно синтезирующие костную матрицу [Riggs B.L., Melton III L.J., 1995].

Сосудистая ниша состоит из синусоидальных эндотелиальных клеток, выстилающих синусоидальные сосуды, и способствует распространению и дифференциации активно пролиферирующих ГСК [Konopleva M.Y., Jordan C.T., 2011; Tasian S.K. et al., 2018]. Синусоиды взаимосвязаны межсинусоидальными капиллярами и совместно сливаются в центральный синус [He N. et al., 2014].

Эндотелиальные клетки синусоидных капилляров образуют внутреннюю оболочку всех кровеносных сосудов и участвуют в регуляции функций нишевых клеток, снабжая их питательными веществами. Реагируя на сигналы, поступающие от хемокинов, цитокинов и других медиаторов, эндотелиальные клетки ретранслируют и передают информацию кроветворным клеткам посредством паракринного взаимодействия и последующей активации клеточных рецепторов,

тем самым поддерживая жизнедеятельность в условиях покоя или в условиях пролиферативной активности в зависимости от потребности в клетках крови [Vandoorne K. et al., 2018]. Таким образом, сосудистая ниша регулирует процесс самовосстановления пула, дифференцировки и созревания ГСК для повторного заполнения полости костного мозга [He N. et al., 2014].

Сосудистая ниша активируется в процессе кроветворения и поддержания пула ГСК. Во время гемопоэза ГСК мобилизуются из спящего состояния [Abkowitz J.L. et al., 2003; Kopp H.G. et al., 2005], мигрируют в кровоток, проникая в синусоидальную стенку [Wu J.C.F. et al., 2006] и, наконец, дифференцируются в несколько видов клеток крови [Wright D.E. et al., 2001]. В том случае, если костный мозг находится в условиях стресса, экстрамедуллярный гемопоэз возникает также в селезенке или печени (преимущественно, у животных), дополняя функцию аномального костного мозга [Scherpers K. et al., 2012; He N. et al., 2014].

Сосудистая ниша, по сравнению с остеобластной нишей, обеспечивает более богатую питательными веществами микросреду, с более высокими концентрациями факторов роста и кислорода [Abkowitz J.L. et al., 2003; Kopp H.G. et al., 2005].

Еще одной функцией этого типа ниши является поддержка ГСК при трансэндотелиальной миграции. Клетки крови могут легко проходить через мембрану синусоидальных сосудов, потому что она состоит из одного слоя эндотелиальных клеток [Wu J.C.F. et al., 2006]. Таким образом, сосудистая ниша не только активирует пролиферативный и дифференцировочный ответ ГСК в условиях гемопоэтического стресса [Wright D.E. et al., 2001], но также способствует высвобождению ГСК в кровоток [He N. et al., 2014]. Таким образом, в то время как остеобластная ниша поддерживает ГСК в состоянии покоя в костном мозге [Arai F., Suda T., 2004], сосудистая ниша регулирует мобилизацию ГСК [He N. et al., 2014].

Важно отметить, что гемопоэтические клетки могут происходить от эндотелиальных клеток (и те, и другие несут общий маркер CD34) или быть потомками общей родительской клетки (гемангиобласта, common precursors for the blood and endothelial lineages) [Nagai H. et al., 2018]: во время раннего развития

гемопозс сочетается с васкуляризацией, и эндотелий отвечает за возникновение ГСК в области аорта-гонад-мезонефроса (AGM) (участок эмбриональной мезодермы) *in vivo* [He N. et al., 2014].

Согласно проведенным исследованиям, существуют различные клеточные-молекулярные компоненты, осуществляющие специфические функции, которые обеспечивают биохимический сигналинг и физические взаимодействия [клеточные контакты], необходимые для поддержания пула ГСК [Tasian S.K. et al., 2018].

Поддержание жизнеспособности и функциональной активности ГСК в нише обусловлено несколькими клеточными типами, в том числе остеобластами, остеокластами, CXCL12 – избыточными ретикулярными (CAR) клетками, лептин + (LepR +) клетками стромы, нестин + клетками стромы, эндотелиальными клетками, макрофагами, мегакариоцитами, нейронами и немиелинирующими клетками Шванна [Wang W. et al., 2018].

Исследования *in vitro* сокультивирования остеобластов и гемопозитических предшественников показали, что остеобласты могут поддерживать клетки-предшественники, продуцируя широкий спектр факторов роста, включая G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, CSF3) [Taichman R.S. et al., 2000].

Гемопозитические очаги возникают в тесной связи с костной тканью. Можно обнаружить, что часть гемопозитических клеток плотно соединяется с поверхностью эндостальной кости, которая выстилается в основном остеобластами. Подобное анатомическое расположение предполагает потенциальную роль остеобластов в регуляции ГСК [Taichman R.S., 2005].

Почти 50% стромальных фибробластов костного мозга человека образуют кость, когда их трансплантировали *in vivo*. Клоны, полученные из фибробластов, набирают гемопозитических предшественников циркулирующего хозяина, чтобы восстановить полностью функциональный мозг происхождения реципиента [Kuznetsov S.A. et al., 1997].

Остеобласты обычно находятся в слое вдоль эндоста (внутренние поверхности кости) на границе между костной мышцей и костным мозгом. Остеобластический пул клеток включает (от примитивных к наиболее зрелым)

ММСК, клетки предшественники, в том числе остеобласты и остециты [Maskie E.J., 2003]. Подтипы остеобластов могут участвовать в регуляции гемопоэтических клеток-предшественниц [Yin T., Li L., 2006]. Сами остеобласты представляют собой гетерогенную клеточную популяцию с трабекулярными и эндостальными веретенновидными клетками подкладки эндоста и овальными клетками, которые являются прямыми предшественниками остецитов [Frisch B.J. et al., 2008].

Впоследствии две исследовательские группы одновременно обнаружили, что у мутантных мышей с увеличением числа остеобластов также возрастает количество ГСК в костном мозге. Этот вывод стал первым доказательством *in vivo*, что остеобласты функционируют в костном мозге, в том числе, для регуляции численности и функциональной активности ГСК [Calvi L.M. et al., 2003; Zhang J. et al., 2003].

С другой стороны, истощение остеобластов с использованием генетических или химических подходов не вызывает значительного влияния на изменение числа ГСК [Gao X. et al., 2018], в связи с чем до конца непонятно - играют ли остеобласты прямую роль в регуляции функции ГСК.

Остеобластическая ниша может обеспечить стабильную среду для поддержания ГСК. Сосудистая ниша, напротив, облегчает трансэндотелиальную миграцию ГСК во время мобилизации или самонаведения и может способствовать распространению ГСК и дальнейшей дифференциации [Yin T., Li L., 2006].

1.3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИГНАЛЫ НИШИ ГСК

Гематопоэтические клетки имеют собственную стромальную среду, известную как гемопоэтическое индуктивное микроокружение (ГИМ) [Trentin J.J., 1971]. Концепция ГИМ возникла из-за необходимости ответа на основные вопросы о миграции, контроле над пролиферацией и дифференциацией лимфогематопоэтических клеток [Boggs SS., 1999].

Изучение ГИМ, основанное на исследованиях микроскопии (световая и ультраструктурная), [Lichtman M.A., 1981] или системах культивирования *ex vivo*

[Dexter T.M. et al., 1977], идентифицировали фибробласты, ретикулярные клетки, эндотелиальные и адвентициальные клетки, адипоциты, остеокласты и остеобласты. Типы клеток ниш и их функции подробно представлены в публикации [Smith J.N.P., Calvi L.M., 2013]. Однако точная идентичность типов клеток, содержащихся в нише ГСК, остается на сегодняшний день неизвестной [Purton L.E., Scadden D.T., 2008].

Классически гематопоэтическая ниша – это структурно-функциональный участок, в котором располагается и самовосстанавливаются ГСК. За пределами ниши ГСК не самообновляются и начинают процесс дифференциации, чтобы, в конечном итоге, произвести зрелые клетки крови [Purton L.E., Scadden D.T., 2008].

Таким образом, ниша ГСК требует конечного размера, чтобы клетка могла покинуть ее. Размер ниши жестко контролируется *in vivo*, для поддержания постоянного числа ГСК и нормального гемопоэза [Schofield R., 1978]. В противном случае, возникают гематологические расстройства.

Меж- и внутриклеточные сигнальные пути, по-видимому, являются быстро развивающейся областью в исследовании ниш. Тем не менее, неясно как все молекулы и пути представлены в нишах вдоль или рядом с системным ГИМ, поскольку детали все еще неопределены. Анализ сигналов, генерируемых нишей, начался с экспрессии генов в ГСК и стромальных клетках [Kfoury Y. et al., 2015].

В регулировании ниши задействованы множество отдаленных и локальных сигнальных молекул, и путей, в том числе:

1) SCF / c-Kit (v-kit Hardy-Zuckerman 4), человеческие гомологи протеинов дрозофил Jagged / Notch, Ang-1 / Tie2 (рецептор тирозинкиназы), Wnt (гомолог млекопитающих *Drosophila* бескрылые) лиганды / β -catenin и Ca^{2+} - чувствительный рецептор (CaR) [Yin T., Li L., 2006; Forsberg E.C., Smith-Berdan S., 2009; Smith J.N.P., Calvi L.M., 2013].

2) Поддерживающие форму, растворимые цитокины и секретируемые факторы роста [BMP, TPO, IL-3, IL-6, SCF, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), трансформирующий фактор роста (TGF, VEGF), $TNF\alpha$, играют роль в регуляции стволовых клеток. Факторы роста олиго- и унипотентных гематопоэтических предшественников (например,

эритропоэтина) больше, чем простые факторы выживания и могут динамически изменять поверхность клеток эритробласта и его микроокружение [Sathyanarayana P. et al., 2007].

3) Мембранные факторы, в том числе сосудистые (VCAM) и внутриклеточные (ICAM) клеточные адгезионные молекулы, интегрины клеток и внеклеточный матрикс (N-кадгерин / β -катенин, интегрин остеопонтин / β 1, очень поздний антиген VLA-4 [α 4 β 1] / VCAM-1 и т. д.) [Yin T., Li L., 2006; Forsberg E.C., Smith-Berdan S., 2009; Smith J.N.P., Calvi L.M., 2013].

4) Хемокины для ГСК и гемопоэтических клеток-предшественников: самонаведение и мобилизация: SDF-1 (также называемый CXCL12) и его рецептор CXCR4; FGF-4 и его рецепторы FGFR и G-CSF. Эндотелиальные клетки, остеобласты и другие стромальные клетки конститутивно экспрессируют SDF-1, тогда как ГСК продуцируют CXCR4 [Yin T., Li L., 2006; Forsberg E.C., Smith-Berdan S., 2009; Smith J.N.P., Calvi L.M., 2013].

5) Простагландин E2 (PGE2), локально секретируемый остеобластами, считается потенциальным медиатором развития PTH-зависимого ГСК [Frisch B.J., Porter R.L., Calvi L.M., 2008].

6) Системный PTH/ паратиреоидный гормон-связывающий пептидный рецептор (PPR) [Calvi L.M. et al., 2003], регулирует размер остеобластической ниши ГСК в мышинных моделях [Adams G.V. et al., 2007].

7) Сеть внеклеточного матрикса [коллаген, ретикулин, фибронектин, ламинин, тенаскин, гемонектин, протеогликаны, гликозаминогликаны и т. д.], продуцируемые ММСК [Zipori D., 1989].

Гликопротеин матрицы, остеопонтин, является отрицательным регуляторным элементом ниши стволовых клеток, который ограничивает размер пула стволовых клеток и может служить механизмом для ограничения избыточной экспансии стволовых клеток в условиях нишевой стимуляции [Stier S. et al., 2005].

1.4. РОЛЬ ВОСПАЛЕНИЯ В ЗАЖИВЛЕНИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОСТНОЙ ТКАНИ

Повреждение костной ткани сопровождается (микро)сосудистой сети в окружающих мягких тканях, эндостальной и периостальной поверхностях кости, а также в костном мозге, что приводит к геморрагии с последующим формированием гематомы, активации тромбоцитарного звена гемостаза и ферментных систем свертывания крови [Loi F. et al., 2016]. Образованная гематома заполняет пространство между костными отломками, связываясь таким образом с костным мозгом, кортикальной костью, надкостницей, эндостом и мышцей, что необходимо для процесса регенеративного заживления кости [Schmidt-Bleek K. et al., 2015].

Воспаление – это немедленная защитная реакция на повреждение ткани, которая служит для подготовки ткани к возможному восстановлению и заживлению [Schmidt-Bleek K. et al., 2015]. Во время острой воспалительной фазы заживления перелома наблюдается приток нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов и других клеток, которые являются основным источником провоспалительных цитокинов [Kolar P. et al., 2010].

Таким образом, каскад костного заживления начинается с воспалительной реакции, при которой иммунные клетки, присутствующие в гематоме, высвобождают разнообразные цитокины, инициируя таким образом процесс заживления. При этом выраженность воспалительной реакции в каскаде заживления кости важна для начала ангиогенеза. Несостоятельность воспалительной реакции может замедлять процесс инициации ангиогенеза [Schmidt-Bleek K. et al., 2014; Schmidt-Bleek K. et al., 2015]. Временной контроль воспалительного ответа имеет решающее значение для эффективной регенерации. Процессы миграции и последующей дифференцировки ММСК также необходимы для продуктивного регенеративного процесса [Schmidt-Bleek K. et al., 2015].

ММСК, а также клетки-производные (в том числе, фибробласты, остеобласты, хондробласты) ответственны за высвобождение воспалительных цитокинов, как в течение первых 3–7 дней после травмы, так и последующих фаз заживления [Kon T. et al., 2001; Loi F. et al., 2016].

Воспалительные медиаторы и факторы роста, происходящие от тромбоцитов и макрофагов, управляют пролиферацией, дифференцировкой и продуцированием внеклеточного матрикса мигрировавших ММСК и остеопрогениторных клеток с дополнительными факторами роста, высвобождающимися из ремоделируемого внеклеточного матрикса [Gerstenfeld L.C. et al., 2003; Tsiridis E. et al., 2007].

Макрофаги стимулируют миграцию ММСК посредством секреции TNF- α , IL-1, IL-6, CCL2 и регулируются при активации нормальных Т-клетках, которые экспрессируют и секретируют RANTES (CCL5) [Kon T. et al., 2001; Anton K. et al., 2012; Loi F. et al., 2016].

Было показано, что интерлейкины-1 и -6 (IL-1 и IL-6) и TNF- α вызывают системную реакцию на повреждение путем миграции иммунокомпетентных клеток в очаг повреждения, усиления синтеза внеклеточного матрикса и стимуляции ангиогенеза [Kon T. et al., 2001]. Продукция этих цитокинов достигает пиковых значений в течение первых суток, но снижается до следовых значений к 3 дню [Kon T. et al., 2001]. Как правило, провоспалительные медиаторы, в том числе TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11 и IL-17, могут инициировать костную резорбцию за счет повышения активности и дифференцировочного потенциала остеокластов и ингибирования дифференцировки остеобластов [Loi F. et al., 2016]. Процесс остеокластогенеза важен для удаления минерализованного хряща [Ai-Aqi Z.S. et al., 2008].

IL-1 и TNF- α синергически стимулируют остеокластогенез прямо и косвенно через стимуляцию экспрессии RANKL [Tan S.D. et al., 2006]. Помимо стимулирования функции остеокластов, TNF- α способствует миграции ММСК и инициирует апоптотическую гибель хондроцитов в период формирования эндохондральной кости. Его отсутствие замедляет резорбцию минерализованного хряща, впоследствии предотвращая формирование новой костной ткани [Ai-Aqi Z.S. et al., 2008].

Эффекты IL-1 на заживление кости сходны с эффектами TNF- α . IL-1 инициирует продукцию IL-6 в остеобластах и принимает участие в выработке первичного хрящевого каллуса и ангиогенезе в поврежденном месте [Kon T. et al., 2001].

IL-6 опосредует остеокластогенез и участвует в клинических сценариях, таких как болезнь Педжета и ревматоидный артрит [Mori G. et al., 2013], однако, по мнению [Loi F. et al., 2016], не является необходимым фактором.

1.5. ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОЦЕССОВ ВОСПАЛЕНИЯ И АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Реваскуляризация хрящевой ткани приводит к дифференцировке остеопрогениторных клеток в остеобласты и отложению костного матрикса на каркасе хряща [Gerstenfeld L.C. et al., 2003; Tsiridis E. et al., 2007].

Процессы ангиогенеза и воспаления тесно связаны. Не только их инициация и прогрессирование важны для успешного результата, но также важны их своевременное начало, завершение и баланс между этими процессами [Schmidt-Bleek K. et al., 2015]. Согласно данным авторов, регенеративное заживление начинается уже через 60 часов после травмы кости. В модели с отсроченным заживлением при длительном воспалительном процессе реваскуляризация замедляется. Schmidt-Bleek K. и Lienau J. убедительно доказали, что у пациентов с отсроченным заживлением, обусловленным длительной воспалительной реакцией, продукция ангиогенного фактора в области повреждения существенно уменьшается [Lienau J. et al., 2009; Lienau J. et al., 2010; Schmidt-Bleek K. et al., 2009]. Это наблюдение демонстрирует связь воспаления и возникновения ангиогенных процессов и их влияние на успешный результат заживления кости.

В физиологических условиях реваскуляризация после травмы индуцируется гипоксией и воспалением [Schmidt-Bleek K. et al., 2015].

Несмотря на то, что многие иммунные клетки (в том числе макрофаги, Т-клетки), могут функционировать в состоянии анаэробного гликолиза, зачастую активируясь при повреждении [Gaber T. et al., 2009], однако, для других клеток, в том числе, эндотелиальных клеток-предшественников, низкое содержание кислорода, повышенные значения рН и высокие концентрации Na и K считают проблемой для эффективного функционирования [Street J. et al., 2000].

Для выживания клеток-предшественников также необходимо восстановление кровоснабжения. Именно поэтому ревазуляризация считается наиболее важным процессом для успешной регенерации.

Несмотря на то, что исследования ангиогенеза исторически были сосредоточены, естественно, на роли сосудистых клеток, в настоящее время становится очевидным, что иммунные клетки также играют значительную роль в этом процессе [Schmidt-Bleek K. et al., 2015]. Иммунные клетки и иммунные сигналы инициируют и регулируют процесс ревазуляризации.

Гемопоэтическая ниша костного мозга получает различные сигналы во время инфекций и воспалений, которые действуют на ГСК и инициируют «экстренный» гранулоцитопоз посредством секреции медиаторов воспаления, фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина-1 (IL-1) и интерферонов I и II типа [Calvi L.M., Link D.C., 2015].

Использование в эксперименте липополисахарида (воспалительного компонента стенки бактерий, ЛПС), инициировало не только дифференцировку клеток, но и продукцию зрелых миелоидных клеток, включая нейтрофилы [Nagai Y. et al., 2006], которые служат первой линией защиты от инфекции, а также вызывало усиленную пролиферацию ГСК и ангиогенный ответ, включая глубокое ремоделирование сосудистой сети костного мозга [Vandoorne K. et al., 2018].

Многие клетки, включая ГСК и эндотелиальные клетки [Kang S. et al., 2009], экспрессируют TLR. После активации TLR макрофаги секретируют VEGF [Vandoorne K. et al., 2018], тем самым стимулируя ангиогенез, этот процесс регулируется интегринами. Экстренный гемопоэз, вызванный LPS, происходит в костном мозге и сопровождается увеличением отношения VEGF/ANGPT1 (vascular endothelial growth factor/angiopoetin-1), активацией интегрина, формированием новых сосудов, увеличением объемной доли крови [Vandoorne K. et al., 2018]. Исследования показывают, что цитокины, продуцируемые различными периваскулярными линиями ниши ГСК, вносят особый вклад в поддержание ГСК [Gao X. et al., 2018].

Макрофаги костного мозга, реагирующие на G-CSF, играют ключевую роль в поддержании функции остеобластов в эндостеуме [Winkler I.G. et al., 2010;

Christopher M.J. et al., 2011], тогда как макрофаги костного мозга, имеющие фенотип CD169+, регулируют мезенхимальные клетки в сосудистых нишах [Chow A. et al., 2011].

In vivo истощение макрофагов привело к мобилизации ГСК в кровь [Winkler I.G. et al., 2010]. Это было подтверждено независимыми исследованиями, показывающими, что мобилизация ГСК, индуцированная G-CSF, зависит от SDF-1, экспрессируемого на эндотелиальных клетках костного мозга, который способствует проникновению гемопоэтических предшественников в эндотелий, что приводит к их дифференциации [Lapidot T., Petit I. 2002; Christopher M.J. et al., 2011].

1.6. РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

Разрушение кости, вызванное травмой, инфекцией или заболеваниями костей, требует адекватной замены поврежденного участка костной ткани. Использование аутогенных костных трансплантатов остается золотым стандартом, однако ограниченная доступность аутогенной ткани и неблагоприятные иммунные реакции на аллотрансплантаты ограничивают их использование и выявляют потребность в синтетических биоматериалах [Brydone A.S. et al., 2010].

1.6.1. Аутологичные костные трансплантаты

Костный трансплантат, извлеченный из анатомического участка и пересаженный в другое место у одного и того же индивидуума, называется аутологичной трансплантацией кости [Roberts T.T., Rosenbaum A.J., 2012]. Обладая остеокондуктивными, остеоиндуктивными и остеогенными свойствами, аутологичный костный трансплантат может быстрее и полностью интегрироваться в кость хозяина, поэтому считается золотым стандартом в лечении костных дефектов и эталоном при оценке других костных трансплантатов и заменителей. К недостаткам аутогенного трансплантата относится процесс взятия материала, включая осложнение и боль в донорском участке, повышенную кровопотерю, увеличенное

время операции, возможность заражения донорским участком и ограниченный объем доступного материала [Khan S.N. et al., 2005; Roberts T.T., Rosenbaum A.J., 2012; Chiarello E. et al., 2013].

1.6.2. Аллогенные костные трансплантаты

Аллогенный костный трансплантат относится к костной ткани, которую отбирают у одного индивидуума и пересаживают генетически отличному индивидууму той же видовой принадлежности [Roberts T.T., Rosenbaum A.J., 2012]. Учитывая ограничение аутологичных костных трансплантатов, костный аллотрансплантат считается лучшей альтернативой аутооттрансплантатам и эффективно используется в клинической практике, особенно у пациентов с плохим заживляющим потенциалом, установленным несращением и обширным измельчением после переломов [Bhatt R.A., Rozental T.D., 2012]. Установлено, что по сравнению с аутооттрансплантатами, аллотрансплантаты являются иммуногенными и демонстрируют более высокую частоту осложнений, что обусловлено активацией антигенов главного комплекса гистосовместимости (МНС) [Stevenson S., Horowitz M., 1992]. Важной проблемой в использовании аллогенных костных трансплантатов является риск передачи вируса, который в настоящее время значительно снижен благодаря развитию современных банков тканей [Khan S.N., 2005] и совершенствованию технологии обработки биоматериалов [Voggenreiter G., 1994]. Исходя из этих ситуаций, применение свежих аллотрансплантатов всегда ограничено, и сохраненные модифицированные аллотрансплантаты обычно предпочтительнее в клинической практике [Lippincott U.M., 1980].

1.6.3. Искусственные заменители костного трансплантата

Серьезная нехватка естественных костных трансплантатов, выраженные побочные эффекты и малые шансы на удовлетворение потребностей у пациентов пожилого возраста [Greenwald A.S. et al., 2010] вызвали расцвет рынка

искусственных заменителей костных имплантатов [Khan S.N., 2005]. В настоящее время используется большое количество различных биоматериалов в зависимости от назначения имплантируемого устройства [Paulo M.J.E. et al., 2017]. Для областей с высокой механической нагрузкой обычно используются металлы и оксиды металлов [Brydone A.S. et al., 2010].

Для восстановления костных дефектов была разработана разлагаемая керамика и полимеры, которые могут применяться, например, в качестве пористых каркасов, гранул, инъекционных паст и гелей, а также загружаться клетками, факторами роста и другими биологически и фармакологически активными факторами, чтобы управлять процессом регенерации костей или исключить развитие инфекционных процессов в месте имплантации [Möding Y. et al., 2018].

1.7. СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТЕЙ ТРЕХМЕРНЫХ СКАФФОЛДОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Очевидно, что костный ответ зависит не только от биохимического состава биоматериала, но и от биомеханических характеристик поверхности имплантатов. Топографические факторы, такие как размер, текстура поверхности, макро- и микроструктура, форма имплантата, играют решающую роль в клеточной реакции [Beauvais S. et al., 2016]. Эффекты биоматериала с точки зрения биоинертности, биоактивности и биосовместимости важны как для имплантологии, так и для биомеханических характеристик. Биосовместимость означает способность материала вызывать адекватную реакцию у хозяина (человека, животного, органа и клетки) в конкретной ситуации [Williams D.F., 2008; Jäger M. et al., 2017].

Фосфаты кальция (CaPs) являются основным неорганическим компонентом костных тканей и характеризуются биосовместимостью и остеointеграционными свойствами. Покрyтия CaP могут значительно изменить морфологию поверхности и химический состав металлических имплантатов и, улучшая биофункции их поверхности, включая характеристики остеointеграции, коррозии и разложения, а также антибактериальные свойства. Поверхностные свойства биоматериалов, включая морфологию поверхности и смачиваемость, являются критическими при имплантации в организм человека [Nel A.E. et al., 2009; Planell J.A., 2010].

Морфология поверхности оказывает прямое и существенное влияние на возможности и функции клетки [Teixeira A.I. et al., 2003; Fu J. et al., 2010; Yang Y. et al., 2017], однако, адгезия клеток на супергидрофильных и смачиваемых супергидрофобных поверхностях сильнее, чем на других поверхностях, включая несмачиваемую супергидрофобную поверхность [Meng J., 2017; Su Y. et al., 2019]. Как основной неорганический компонент в костной ткани [Le Geros R. Z., 1991], фосфат кальция (CaP) обладает присущей ему биосовместимостью при применении в качестве биоматериалов в организме человека [Anselme K., 2000]. Растворимость CaPs является важным параметром, при рассмотрении возможности использования биоматериала в клинической практике, особенно с точки зрения контроля цитотоксичности [Morimoto S. et al., 2012] и воспалительного ответа [Walschus U. et al., 2009]. Было показано, что CaPs являются остеокондуктивными, но не остеоиндуктивными [Hannink G., Arts J.J.C., 2011; Samavedi S., 2013]. Остеокондуктивные свойства зависят от нескольких архитектурных особенностей CaPs, таких как геометрия поверхности, топография, химия и заряд, пористость и размер пор.

Разработка объемных материалов на основе CaP ограничена их низкой пластичностью из-за слабых ионных связей [Suchanek W., Yoshimura M., 1998]. Таким образом, CaPs были разработаны в качестве костного цемента для заполнения костных зазоров в клинической практике и для покрытия поверхности материалов имплантатов для повышения биосовместимости поверхности и улучшению биофункций [Paital S.R., Dahotre N.B., 2009; Shadanbaz S., Dias G.J., 2012; Surmenev R.A. et al., 2014; Dorozhkin S.V., 2014]. Во многих предыдущих исследованиях было продемонстрировано, что различные покрытия CaP могут значительно улучшить биологические свойства металлических имплантатов [Surmenev R.A. et al., 2014]. Как физические, так и химические методы были разработаны для получения покрытий CaP на металлических материалах. В настоящее время физическое осаждение может быть достигнуто с помощью плазменного распыления, радиочастотного магнетронного распыления, импульсного лазерного осаждения (PLD) и ионно-лучевого осаждения (IBAD). Химические методы включают биомиметическое осаждение, электрохимическое

осаждение, микродуговое окисление, электрофорез, золь-гель, химическое превращение и гидротермальное осаждение.

При выборе метода нанесения покрытия, в первую очередь необходимо учитывать металл подложки. Так, все физические и золь-гель методы обычно подходят для металлов и сплавов с высокой температурой плавления (например, Ti, Fe), в то время как влажные химические методы лучше использовать для металлов (например, Mg, Zn) и сплавов с низкой температурой плавления. Метод химической конверсии может применяться только к легко корродируемым сплавам (например, сплавы на основе Mg, Zn и Fe).

Толщина покрытия является еще одним важным фактором при выборе подходящего метода покрытия. Плазменное напыление подходит для формирования толстых покрытий (30–200 мкм), а влажные химические методы, такие как золь-гель, биомиметическое погружение или химическая конверсия, могут дать толщину менее 1–20 мкм, распыление или лазерные методы могут привести к еще более тонким покрытиям - 0,1–5 мкм [Yang Y. et al., 2005; Narayanan R. et al., 2008]. Кроме того, адгезия покрытия, нанесение и стоимость должны учитываться в клинической практике [Harun W. et al., 2018]. Например, адгезионная прочность покрытия на костных имплантатах должна быть выше, чем у твердой ткани. Покрытие на костных винтах должно быть достаточно жестким, чтобы обеспечить процесс имплантации без растрескивания или отслаивания покрытия. Более того, хорошей тенденцией является применение комбинированных способов получения покрытий с использованием вышеуказанных методов и технологий, а также образования биокompозитов и многослойных покрытий [Johnson A.J.W., Herschler B.A., 2011; Zhou H. et al., 2012]. Это потенциальная процедура для преодоления недостатков одного метода и получения покрытий на основе CaP с новыми свойствами и биологическими характеристиками [Su Y. et al., 2019].

1.7.1. Особенности топографии поверхности искусственных скаффолдов – прототипов костной ткани

Как известно, топография поверхности минерализованной поверхности кости существенно влияет на клеточные реакции [Dellatore S.M. et al., 2008].

Поверхностная пористость влияет на остеоинтеграцию, позволяя вращать остеогенным клеткам в имплантат, тем самым укрепляя поверхность контакта кости с имплантатом [Ryan G. et al., 2006]. Общеизвестно, что имплантаты со связанными порами демонстрируют улучшенное врастание в кость по сравнению с имплантатами с закрытыми порами [Gittens R.A. et al., 2012]. Это объясняется улучшением врастания сосудистой сети [Yoshikawa H. et al., 2009]. Кроме того, было предположено, что поры не должны превышать 1 мм, так как такой размер способствует врастанию фиброзной, но не костной ткани [Ryan G. et al., 2006].

Шероховатость поверхности влияет на клеточную дифференцировку. Коллектив авторов относительно недавно продемонстрировал способность рельефа покрытий биомиметических гидроксиапатитов влиять на прикрепление и дифференцировку остеобластов и резорбтивную активность остеокластов. Прикрепление и дифференцировка остеобластов были более сильными на более сложных поверхностях с высоким уровнем шероховатости (показатель шероховатости $R_a \sim 2$ мкм), чем на более гладких поверхностях ($R_a \sim 1$ мкм). Напротив, активность остеокластов была значительнее на более гладких поверхностях, чем на более шероховатых [Costa D.O. et al., 2013].

Следовательно, шероховатые кальцийфосфатные поверхности способны стимулировать остеогенную дифференциацию *in vitro* [Litvinova L.S. et al., 2018].

Кроме того, микродуговая технология для моделирования архитектуры пористой кости с помощью шероховатой SP-поверхности с $R_a = 2-3$ мкм приводит *in vivo* к максимальному эктопическому ремоделированию костной ткани/костного мозга у мышей [Terleeva O.P. et al., 2010; Gnedenkov S.V. et al. 2011].

1.7.2. Биосовместимость кальцийфосфатного покрытия, используемого в регенеративной медицине

Биосовместимость является важной и необходимой способностью биомедицинских материалов [Su Y. et al., 2019]. Процесс имплантации обычно сопровождается травмой костной ткани, при которой поверхность имплантата соприкасается с кровью и сразу же покрывается белками плазмы. После этого успешная интеграция в окружающую кость и регенерация кости, в отсутствие фиброзной капсулы, зависят от сбалансированного иммунного ответа на биоматериалы [Möding Y. et al., 2018].

Прогрессивная реабсорбция и замена биоматериала нормальной костью также считается преимущественным свойством, поскольку инертные заменители влияют на ремоделирование кости и могут нарушить ее структуру и механическое сопротивление [Paulo M.J.E. et al., 2017].

Общепринято, что керамика на основе CaP может вызывать быстрое биологическое связывание и, таким образом, хорошую клиническую эффективность благодаря превосходной скорости остеоинтеграции на начальной стадии [Cunningham B.W. et al., 2009; Surmenev R.A. et al., 2014]. Процесс имплантации обычно вызывает локальное снижение pH и, таким образом, вызывает коррозию или растворение металлической подложки и поверхностного покрытия. Высвободившиеся ионы металлов и Ca^{2+} и PO_4^{3-} могут взаимодействовать с окружающими клетками и тканями, а также могут пересаживаться в форме апатита или композитов с коллагеном. Например, CaPs также могут влиять на клеточное поведение остеобластов и остеокластов в процессе формирования кости [Chai Y.C. et al., 2012]. Химический состав, растворимость и топография поверхности играют существенную роль в указанных процессах [Costa D.O. et al., 2013]. CaPs, включенные в некоторые элементы [например, стронций, кремний], могут дополнительно усиливать активность остеобластов, одновременно ингибируя дифференцировку остеокластов [Su Y. et al., 2019; Chung C., Long H., 2011].

Кроме того, покрытие CaP с пористыми структурами может служить носителем для антимикробных биомолекул с хорошей биосовместимостью. Антимикробный пептид (АМФ) является одной из квалифицированных

биомолекул, его добавляют к покрытию CaP на поверхности Ti для обеспечения антибактериальных свойств без угрозы для биоактивности поверхности [Kazemzadeh-Narbat M. et al., 2010; Su Y. et al., 2019].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Системы искусственного жизнеобеспечения, предназначенные для стволовых клеток, моделируются по структурному дизайну и составу внеклеточного матрикса [Green D.W. et al., 2012]. Нишевая иерархия запрашивает ортодоксальное определение ниши ГСК как места, позволяющего размножаться стволовым клеткам, сохранять их стволовость и способность к самообновлению. Логично, что предполагаемые факторы внеклеточного матрикса должны суммироваться стохастически в ограниченной области, чтобы оказывать влияние на поведение стволовых клеток.

Биоинженерия предоставляет обширные перспективы направления нишевого дизайна в качестве подхода к регенеративной медицине. Они связаны с двумя основными стратегиями нишевых технологий. Текущая обширная стратегия заключается в использовании биоматериалов с поверхностями и объемами, предназначенными для имитации и объединения многочисленных биологических компонентов потенциальных нишевых факторов. Такие материалы обеспечивают научную основу для стохастического проектирования синтетического внеклеточного матрикса для изучения стохастических реакций стволовых клеток и для случайного скрининга разрабатываемых скаффолдов для регенеративной медицины. Таким образом, ниша стволовых клеток является отдельной структурно-функциональной, энергетически (термодинамически) благоприятной микротерриторией, где количественные параметры микроокружения способствуют качественному контролю, определяющему поведение, гомеостаз и направление дифференцировки стволовых клеток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект и материал исследования

Материалом для исследования служила культура мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток, полученных из жировой ткани человека (далее ММСК-ЖТ), сокультивируемых с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием (КФ), что позволяет моделировать границу раздела кость/кровотворное микроокружение. Работа с первичными культурами мезенхимальных стволовых клеток, полученными из подкожной жировой клетчатки человека, проводилась с соблюдением всех биоэтических норм и в соответствии с одобрением комиссии по этике Балтийского федерального университета им. И. Канта: №1 от 22.03.2021 г. Предварительно были получены информированные согласия условно здоровых доноров на участие в исследовании и использовании биобразцов жировой ткани.

Все исследования были проведены в Центре иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта (директор Центра – д-р мед. наук, Л.С. Литвинова).

Экспериментальные образцы имплантатов с микродуговым КФ покрытием, используемых в настоящем эксперименте [Terleeva O.P. et al., 2010] были изготовлены в электролите из наночастиц гидроксиапатита (ГАП) в институте физики прочности и материаловедения СО РАН (Томск).

2.2. Получение культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток из липоасpirата жировой ткани человека

Культура ММСК-ЖТ была получена из липоасpirата жировой ткани условно здорового человека, согласно юридическим и этическим принципам проведения медико-биологических исследований с использованием биоматериала человека, принятых на территории РФ, а также в соответствии с Хельсинской декларацией ВМА (2000 г.) и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999 г.), с полным соблюдением конфиденциальности и информированием пациентов.

Первичные культуры мезенхимальных стволовых клеток получали из подкожной жировой клетчатки человека, методом механической и ферментативной дезагрегации тканей [Zuk P.A. et al., 2001].

Липоаспират (объемом 50 мл) гомогенизировали в небольшом объеме среды, затем ферментировали раствором коллагеназы 1 типа («Sigma», США) в течение 60 минут при 37°C в орбитальном шейкере-инкубаторе (200 об/мин) («Biosan», Литва). Далее, полученную фракцию несколько раз отмывали в фосфатно-солевом буфере.

Полученную суспензию клеток стромально-сосудистой фракции жировой ткани для дальнейшего культивирования засеивали в культуральные флаконы площадью 25 см² и 75 см² («Eppendorf», Германия) с плотностью посева 10-50×10³ ЯСК/см² в соответствующем объеме полной (ростовой) питательной среды (ППС) на основе αMEM («Sigma-Aldrich», США), содержащей: 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США), 280 мг/л L-глутамин («Sigma-Aldrich», США), пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) («Gibco Life Technologies», США). Определение принадлежности полученных клеток к популяции ММСК проводилось в соответствии с морфологическими критериями по предписанию International Society for Cellular Therapy (ISCT) [Dominici M. et al., 2006].

2.2.1. Подсчет общего числа клеток в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека

Подсчет общего количества клеток (ОКК) в культурах ММСК осуществляли на автоматическом счётчике клеток (Countess TM Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с использованием красителя трипанового синего 0.4% (Trypan blu) («Invitrogen», США). Для определения ОКК в культуре ММСК, 5 мкл клеточной суспензии смешивали с 5 мкл раствора 0,4% трипанового синего. Полученный образец заливали в камеру рабочего слайда (толщина 100 мкм), который помещался в гнездо прибора. Подсчет результатов производился автоматически, с выводением результатов анализа на экран прибора.

Результаты анализа выражали в 10⁶кл/мл.

2.2.2. Проведение дифференцировочной и фенотипической идентификации первичной культуры клеток человека (из липоасpirата жировой ткани) для определения ее принадлежности к пулу мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток

Для определения и доказательства принадлежности культуры клеток к ММСК использовали совокупность следующих параметров:

- 1) жизнеспособность клеток - не менее 95%;
- 2) способность клеток дифференцироваться в основные клеточные направления: хондроцитарное, адипоцитарное и остеоцитарное;
- 3) способность клеток к адгезии на пластике в стандартных культуральных условиях;
- 4) более 95 % клеток должны экспрессировать поверхностные рецепторы ММСК – CD73, CD90, CD105 и быть негативными по маркерам, которые специфичны для гемопоэтических клеток – CD45, CD34, CD20 и CD14.

Для проведения эксперимента использовались клетки с доказанной принадлежностью к популяции ММСК, с жизнеспособностью не менее 95%.

2.2.3. Оценка жизнеспособности культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека

Для регистрации уровня живых и мертвых форм клеток в исследуемых клеточных культурах, использовали метод проточной лазерной цитометрии с привлечением проточного цитометра «MACSQuantAnalyzer» («Miltenyi Biotec», Германия). Детекция живых и мертвых клеток в исследуемых клеточных суспензиях основана на использовании ДНК-связывающих красителей, обладающих дифференциальной проницаемостью для клеточных мембран.

После культивирования, ММСК были тщательно ресуспендированы; далее, производили взятие 12,5 мкл клеточного образца и разводили в 10 раз, посредством добавления 125 мкл коммерческого реагента ViaCount («Millipore», США). После повторного ресуспендирования, полученная смесь помещалась на 5 минут в тёмное место. Далее, полученные образцы анализировали на проточном цитометре, в

соответствии с руководством протокола производителя. На **рисунке 1** приведена стратегия гейтирования ММСК с выявлением популяций живых и мертвых клеток в двумерной гистограмме.

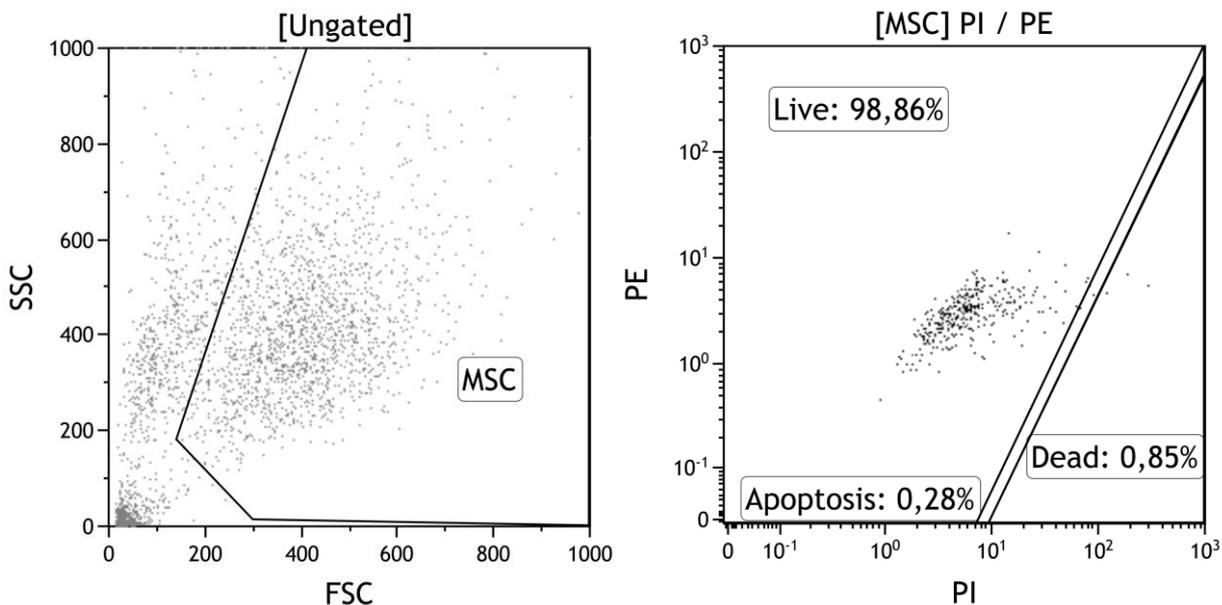


Рисунок 1. Стратегия гейтирования мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека с использованием реагента «GuavaViacount» («Millipore», США).

2.2.4. Детекция дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека методом цитологического дифференциального окрашивания

Для оценки дифференцировочной принадлежности первичной культуры клеток к пулу ММСК, клетки ($0,15 \times 10^4$ кл/мл) культивировались в течение 21 суток в 6-ти луночных планшетах в 3 мл полной питательной среде (ППС) на основе базовой среды α MEM («Sigma-Aldrich», США) (контрольные пробы) или на основе специализированных дифференцировочных сред StemPro® Differentiation Kit («Thermo Fisher Scientific», США) при смене среды каждые 3-4 суток.

Схема экспериментального планшета представлена на **рисунке 2**.

По завершении срока инкубации (21 сутки), из планшетов аккуратно аспирировали ППС, без повреждения клеточного монослоя. Для фиксации культуры ММСК, перед окраской использовали забуференный 10% формалин (инкубация 20-60 минут). После фиксации, монослой клеток дважды промывали раствором фосфатно-солевого буфера. Для выявления дифференцировочного

потенциала ММСК в хондрогенном, остеогенном или адипогенном направлениях, производилось окрашивание клеток раствором альцианового синего («Sigma-Aldrich», США); ализарина красного («Sigma-Aldrich», США) или масляного красного («Sigma-Aldrich», США). По завершении инкубации, раствор красителя отбирали автоматическим дозатором, клеточный монослой дважды промывали деионизованной водой.

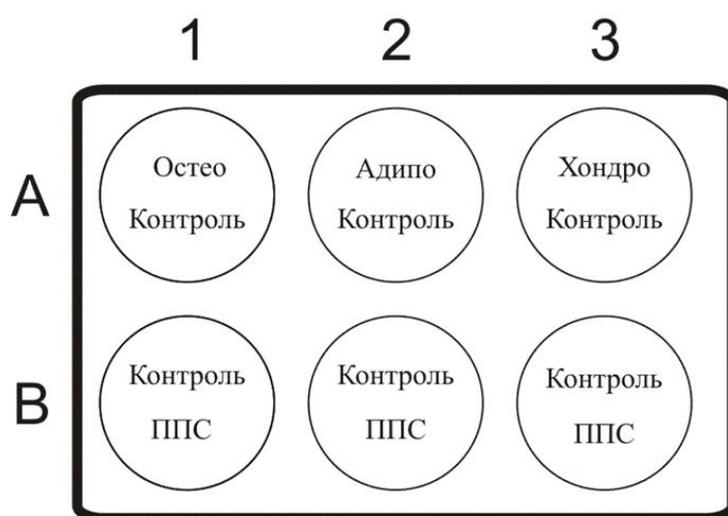


Рисунок 2. Схема экспериментального планшета для оценки дифференцировочной принадлежности первичной культуры клеток к пулу мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека

Результаты окрашивания монослоя клеточной культуры ММСК оценивали с использованием светового микроскопа (**рисунок 3**). Голубая окраска культур после воздействия раствора альцианового синего свидетельствовала о синтезе хондроцитами протеогликанов; окрашивание раствором ализарина красного демонстрировало осаждение кальция клетками и, соответственно, минерализацию межклеточного вещества. Проявление раствора масляного красного показывало присутствие нейтральных триглицеридов и липидов в цитоплазме клеток.

ММСК, проходившие тестирование на способность к дифференцировке, культивировались в течение 21 суток в специализированных дифференцировочных средах StemPro® Differentiation Kit («Thermo Fisher Scientific», США), вследствие чего была выявлена позитивная окраска клеток на ализариновый красный (остеобласты), альциановый синий (хондробласты) и масляный красный

(адипоциты) (**рисунок 3**). Интенсивность окраски сравнивали с интактной культурой при культивировании с использованием ППС без дифференцировочных добавок.

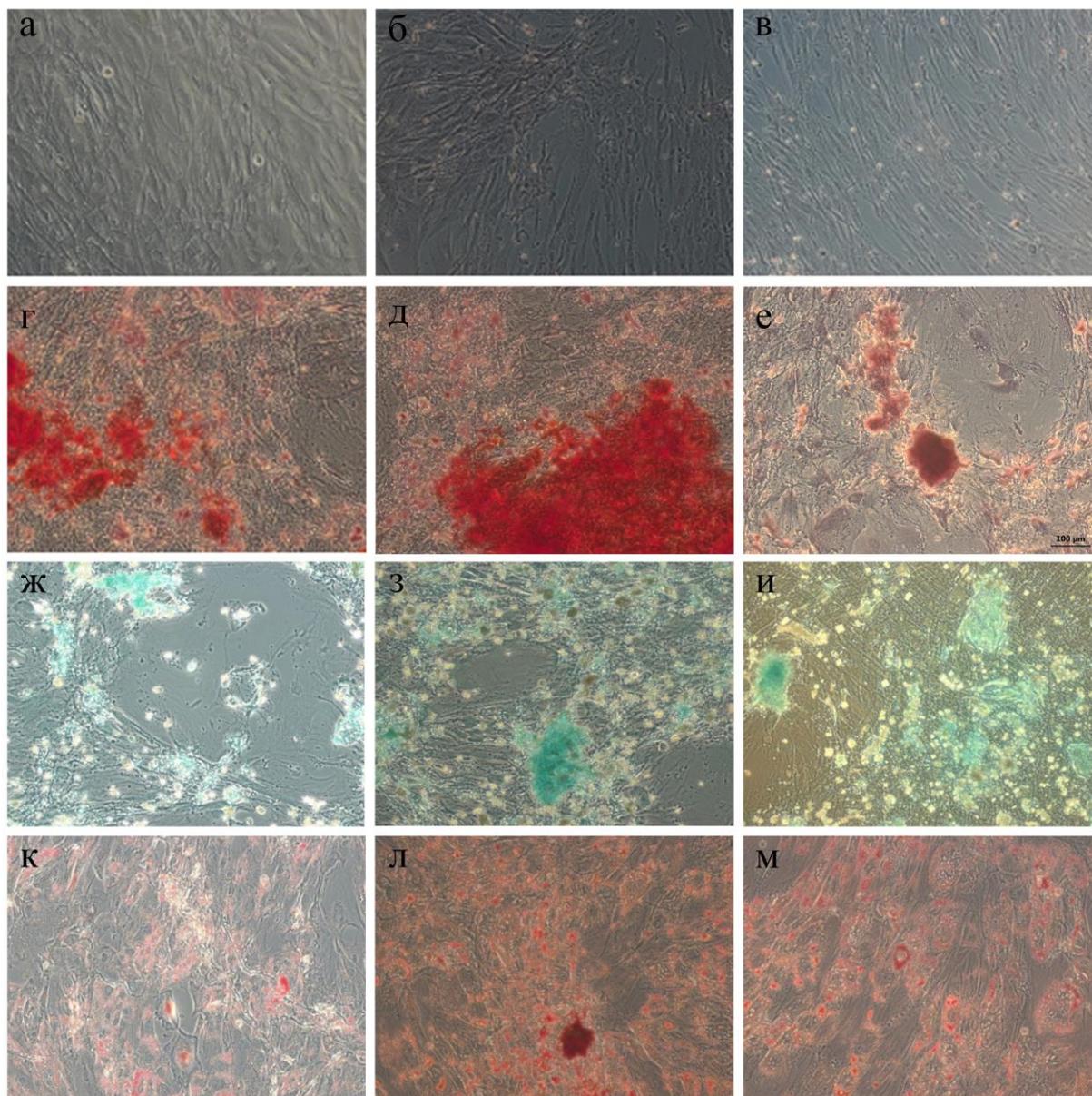


Рисунок 3. ММСК, полученные из липоасpirата ЖТ у условно здорового донора в условиях 21 дня культивирования в следующих вариантах: (А,Б,В) в стандартной среде, (Г-М) в дифференцировочных средах StemPro®. (Г,Д,Е) остеогенная среда, области с минерализованным межклеточным веществом окрашены Alizarine Red; (Ж,З,И) хондрогенная среда, протеогликаны, окрашенные Alcian Blue; и (К,Л,М) адипогенная среда, нейтральные триглицериды с окраской Oil Rad и липиды.

Таким образом, полученная нами из липоаспирата культура ММСК, соответствовала минимальным критериям, установленным Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [Dominici M., 2006]. ММСК имели фибробластоидную морфологию и адгезировались к пластику при стандартных условиях культивирования. Дифференцировочная идентификация клеток, при окрашивании монослоя, после 21 дневного культивирования в дифференцировочной среде, выявила способность ММСК к дифференцировке в клетки мезодермальной природы (остео-, адипо- и хондро направления) (рисунок 3).

2.2.5. Идентификация фенотипических характеристик культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека методом проточной цитометрии

Для фенотипической идентификации культур ММСК до и после культивирования в разных условиях (2D модель, 3D модель), проводили детекцию основных маркеров стромальных (CD105, CD73, CD90) и гемопоэтических (CD45, CD14, CD20, CD34) клеток. Иммунофенотипирование клеток осуществляли с использованием набора MSC Phenotyping Kit human («Miltenyi Biotec», Германия). В состав этого набора входят 2 коктейля: первый (1) содержит меченый изотип-контроль, необходимый для доказательства отсутствия неспецифического связывания антител; второй (2) - антитела, соответствующие мультипотентным стромальным клеткам (CD73, CD90, CD105) и гемопоэтическим клеткам (CD14, CD20, CD34, CD45) (рисунок 4).

Принцип метода основан на детекции рассеивания света лазерного луча от клеток, которые окрашены моноклональными антителами, меченными флуоресцентными метками, при прохождении их через оптическую систему проточного цитометра.

После культивирования, клетки подвергались ферментированию 0,05% трипсином («ПанЭко», Россия), разведенным в 0.53 мМ ЭДТА («Sigma-Aldrich», США), далее два раза отмывали фосфатным буфером. Затем культура подвергалась тщательному ресуспендированию автоматическим дозатором, после чего 0,05 мл

суспензии клеток переносили в микропробирки типа эппендорф и вносили по 1 мкл коктейля антител в соответствии с рекомендациями протокола производителя (pH=7,4). Инкубация клеток с антителами проводилась в течение 10 мин в холодильнике при 4°C. Отмывка клеток проводилась методом центрифугирования (1500 об/мин) в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), 5 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость удаляли дозатором и довели суспензию клеток PBS до 0,2 мл. Анализ фенотипического профиля поверхностных маркеров ММСК проводили в 96-луночных планшетах на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия).

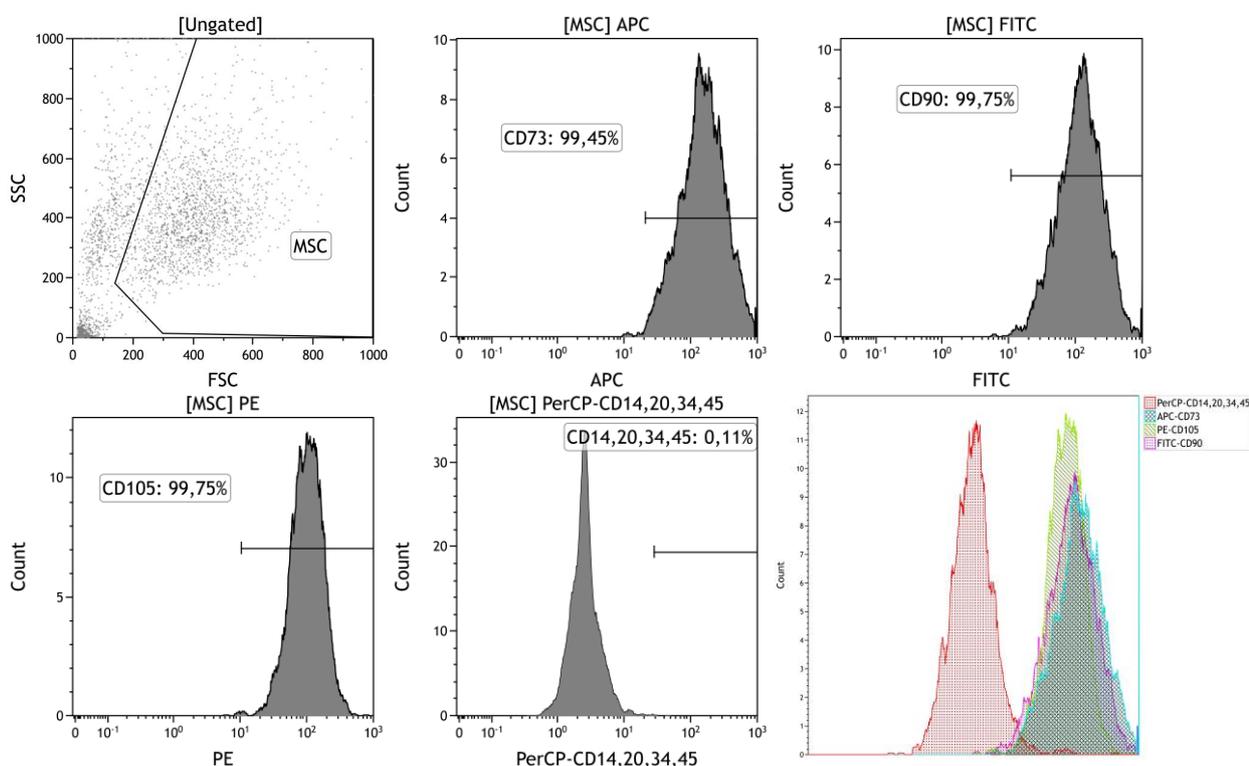


Рисунок 4. Алгоритм выявления популяций (тактика «гейтирования») ММСК контрольного образца. Представлены гистограммы распределения ММСК, которые были получены в результате многоцветного цитометрического анализа с применением коктейля моноклональных антител – MSC Phenotyping Kit, human. а - анализ клеточного распределения по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию выполнен с использованием гейтинга популяции клеток ММСК (MSC). Ось абсцисс – показывает прямое светорассеяние, оценка которого позволяет определить размер клеток; ось ординат – боковое светорассеяние, благодаря которому можно оценить структуру цитоплазмы клеток; б,в,г,д - однопараметрические гистограммы, «гейтированные» с использованием области (MSC); ось абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD73 APC (б),

CD90 FITC (в), CD105 PE (г) и [CD45,34,20,14]⁺ PerCP (д); по оси ординат – количество клеток; е – совмещённые однопараметрические гистограммы.

Популяцию ММСК гейтировали в точечной диаграмме прямого (FSC, ось абсцисс) и бокового (SSC, ось ординат) светорассеивания. Относительную экспрессию целевых поверхностных маркеров оценивали по интенсивности флуоресценции в соответствующих набору координатах (флуоресценция по трем цветам на основе Dot Plot, или гистограммой) (рисунок 4).

Число событий для каждого анализа составляло 10 000 (10 000 клеток). Далее, анализ и обработку изображений с проточного цитометра проводили с использованием автоматического программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США). Результаты фенотипической идентификации позволили констатировать, что более 97% клеток несли на своей поверхности маркеры CD73, CD90 или CD105 и менее 0,5% клеток в исследуемой культуре экспрессировали молекулы CD45, CD34, CD20 и CD14.

2.3. Экспериментальное 2D и 3D культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека

В основе используемых нами подходов к исследованию, лежит разработанная членами научного коллектива трехмерная модель культивирования *in vitro*, предполагающая создание условий активации ММСК, под влиянием продуктов биодegradации трехмерного матрикса (микроокружения), имитирующего рельеф минерального вещества регенерирующей костной ткани. Моделью сравнения служила двухмерная (далее 2D) модель культивирования клеток на гладкой пластиковой поверхности (дно лунки культурального планшета). Согласно данным литературы, между двумерными (2D, культивирование клеток на пластике) и 3D (в том числе, в присутствии трехмерных матриксов) культурами клеток обнаружены существенные различия в поведении клеток [Dellatore S.M., Garsia A.S., Miller W.M., 2008] и экспрессии генов [Birgersdotter A., Sandberg R., Ernberg I., 2005]. Культивирование ММСК проводили в соответствии с задачами

исследования, с соблюдением основных условий культивирования клеточной культуры при 37°C, во влажной атмосфере, в присутствии 5% CO₂.

Для постановки эксперимента подготавливали 50 мл полной питательной среды (ППС) для культивирования (состав: α MEM («Sigma-Aldrich», США), содержащая: 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США), 280 мг/л L-глутамин («Sigma-Aldrich», США), пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) («Gibco Life Technologies», США)).

С целью формирования точки роста клеточной культуры, в планшеты вносили 50 мкл клеточной суспензии в центр пустой лунки в соответствии с протоколом. Через 2 часа лунки планшета промывали физиологическим раствором (0,9% NaCl), для удаления клеточного дебриса. Параллельно осуществляли подготовку искусственных матриц с КФ покрытием, имитирующих регенерирующую костную ткань.

2.3.1. Характеристика искусственных матриц с кальцийфосфатным покрытием, имитирующих регенерирующую костную ткань

Реакцию ММСК на минеральную часть межклеточного вещества костной ткани имитировали посредством добавления в культуру клеток подложек из коммерчески чистого титана (содержание составных элементов в весовых процентах: 99.58 Ti, 0.12 O, 0.18 Fe, 0.07 C, 0.04 N, 0.01 H) BT1.0, имеющих размер 10x10x1 мм³ и несущих рельефное (индекс шероховатости Ra=2,0–3,0 мкм) микроугловое двустороннее КФ покрытие.

Покрытие формировали в анодном режиме с помощью установки Microarc-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск).

Электролит состоял из водного раствора ортофосфорной кислоты (20 мас.%), карбоната кальция (9 мас.%) и синтетического гидроксиапатита (6 мас.%).

Порошок синтетического гидроксиапатита с диаметром частиц 40–100 нм был получен механохимическим способом, как описано ранее [Chaikina M.V. et al., 2008]. Наличие фосфатов кальция в составе покрытия (рентгеноаморфное покрытие с небольшими пиками бета-кальцийпирофосфата (β -Ca₂P₂O₇) и монетита (CaHPO₄) подтверждали рентгенодифракционным анализом.

Элементный состав поверхности КФ-покрытий на титане, изученный с применением электронного микроскопа Quanta 200 ESEM FEG с EDX-анализатором («FEI», Нидерланды), варьировал в следующих диапазонах: Са (6.6–11.4 атомных%), Р (17.4–21.1), О (52.0–62.2), Ti (12.3–17.8). Индекс шероховатости поверхности КФ-покрытий анализировали с применением измерительной системы Talysurf 5–120 («Taylor Hobson Ltd.», Великобритания) с разрешающей способностью 10 нм в соответствии с показателями параметров вертикальных неровностей профиля. Индекс Ra (в диапазоне 2–3 мкм) определяли в соответствии с ГОСТ 2789–73, как средний результат шероховатости поверхности в границах нескольких длин участков измерений.

Основными элементами в структуре КФ-покрытий являются сферолиты (диаметр до 20 мкм), которые формируют скаффолд-подобный (толщиной до 75 мкм) слой и ямки между сферолитами (глубиной до 20 мкм и шириной до 50 мкм). Соответственно, максимальная высота профиля между сферолитами и углублениями (R_{max} по ГОСТ 2789–73) достигала 30–40 мкм. Сферолиты имеют внутренние полости, переходящие в глубокие, взаимосвязанные поры (диаметром до 12 мкм) по всей толщине покрытия. Подобная топография участков КФ-поверхности названа нами остеогенной “нишей-рельеф” [Хлусов И.А. и соавт., 2011]. Она способствует дифференцировке ММСК в остеобласты, поскольку моделирует структурно-функциональное состояние минерального матрикса в фазу остеорезорбции, когда остеокласты формируют блюдцеобразные углубления в поверхности кости глубиной до 40 мкм и растворяют молекулы гидроксилапатита до нестехиометрических фосфатов кальция. В связи с этим, мы рассматривали модельные образцы как симулирующие состояние минерального вещества костной ткани при ее физиологическом ремоделировании. Модельные образцы, при общей толщине более 1 мм, закрывали более 50% площади поверхности в лунках культурального планшета, что подразумевает морфофункциональные реакции клеток, отличные от реакций в стандартной двумерной (2D) культуре клеток на пластике. Образцы трехмерных матриксов с КФ покрытием стерилизовали автоклавированием («BMG Labtech», Германия) при 121°C и 0.5 атм. в течение 45 мин.

Изучение биодegradации образцов с КФ-покрытием проводили в синтетической культуральной среде RPMI 1640 («Sigma-Aldrich», США) с низким содержанием микроэлементов в течение 7 дней при температуре 37°C (2 мл среды на каждый образец согласно рекомендациям ISO 10993-5), как описано ранее [Tverdokhlebov S.I. et al., 2014].

Количественную оценку концентраций кальция (общей фракции и свободного), и неорганического фосфора (фосфатного иона PO_4^{3-}) в экстрактах TiКФ образцов и супернатантах 7-дневной культуры ММСК человека выполняли с погрешностью 1-2% согласно инструкции фирмы-производителя («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab60i («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) с встроенными ионо-селективными электродами [Sharkeev Y. et al., 2019].

2.4. Определение относительного уровня экспрессии мРНК гена *ALPL* методом полимеразной цепной реакции

По окончании срока культивирования (14 суток), клеточные культуры осаждали центрифугированием 5 минут 2000 об/мин. Клетки разбавляли реагентом ExtractRNA («Евроген», Россия) для лизиса клеток. Инкубацию проводили в течение 15 минут с последующим центрифугированием 10 минут 15000g («Eppendorf», Centrifuge 5804R, Германия). Надосадочную жидкость с РНК снимали и переносили в новую пробирку с добавлением хлороформа 200 мкл («Вектон», Россия). Смесь промывали перемешиванием, по 10 секунд каждую минуту, в течение 5 минут. РНК-смесь центрифугировали при 4°C 15000g в течение 15 минут. РНК очищали методом спиртового осаждения: сначала путем добавления 100% изопропанола, затем 80% этанола с центрифугированием по 10 минут 12000g. Остатки спирта высушивали и добавляли 30 мкл воды свободной от РНКаз. Чистоту РНК проверяли на спектрофотометре (Nanovue Plus, «GE Healthcare» Bio-Sciences, Швеция). Качество РНК идентифицировали методом гель-электрофореза по соотношению плотности бэндов 28S/18S рибосомальных субъединиц.

С использованием свободной от РНКаз и ДНКаз воды, исследуемые образцы тотальной РНК доводились до одинаковой концентрации (10 мкг/мл). Для каждого образца была приготовлена реакционная смесь, содержащая РНК матрицу (9 мкл) и праймер oligo(dT)23-primer (4,5 мкл) («Beagle», Россия), использованная для реакции обратной транскрипции. Подготовленные пробирки с исследуемыми образцами устанавливали в амплификатор CFX96 («Bio-Rad», США). Реакция проходила 3 минуты с температурой 70°C; при завершении цикла, образцы убирала на лед.

Смесь из 6-ти мкл пятикратного буфера для синтеза первой цепи, 3-х мкл смеси dNTP (20 мМ), 3-х мкл DTT (20 мМ) и 4,5 мкл MMLV ревертазы вносили по 16,5 мкл в каждую пробу. Образцы устанавливали в амплификатор (CFX96, «Bio-Rad», США) и запускали цикл на 1 час с температурой 42°C, и 10 минут на 70°C.

Определение относительного уровня экспрессии гена ALPL проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя реагенты qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфические зонды TaqMan и праймеры (10пМ) («Beagle», Россия). Референсным геном служил *RPLPO*.

Смесь из пятикратного буфера для синтеза первой цепи, смеси dNTP (20 мМ), 3-х мкл DTT (20 мМ) и MMLV ревертазы вносили в каждую пробу. Образцы устанавливали в ДНК-амплификатор T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США) и запускали цикл на 1 час с температурой 42°C, и 10 минут на 70°C.

Специфичность праймеров и зондов была проведена путём выравнивания на целевые гены с использованием программы Primer BLAST.

Последовательность олигонуклеотидных праймеров: используемых в эксперименте:

	F: 5'-GGGAAATCTGTGGGCATTGT-3'
<i>ALPL</i>	R: 5'-GAGTACCAGTCCCGGTCAGC-3'
	Probe: 5'- FAM-ACCACGAGAGTGAACCATGCCA-BHQ1-3'
	F: 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAACT-3'
<i>RPLPO</i>	R: 5'-GAGTACCAGTCCCGGTCAGC-3'
	Probe: 5'- FAM-ACCACGAGAGTGAACCATGCCA-BHQ1-3'

Оптимизацию условий ПЦР проводили амплификацией пяти последовательных 10-ти кратных разведений кДНК и двумя повторами. Подбор оптимальной температуры для каждой пары праймеров проводили, используя градиентную ПЦР (CFX96 «BioRad», США). Для каждого образца делали три повтора на амплификаторе (CFX96 «Bio-Rad», США). Результат ПЦР анализа был рассчитан методом максимума второй производной (Second Derivative Maximum method), с помощью модифицированной формулы Пфаффла.

$$\text{Относительный уровень экспрессии} = \frac{E_{\text{иссл}}^{\Delta C_{P\text{иссл}}(\text{контр-иссл})}}{E_{\text{реф}}^{\Delta C_{P\text{реф}}(\text{контр-иссл})}}$$

Уровень экспрессии таргетного гена учитывает следующие параметры: фактическая эффективность праймеров (E), разность (Δ) точек пересечения кривых плавления с пороговым уровнем базовой линии (Threshold) (Ct) таргетного гена исследуемой группы с таргетным геном контрольной группы.

2.5. Определение концентрации гемопоэтических факторов, медиаторов с про- и противовоспалительной, проапоптотической и хемокиновой активностью, методом проточной флуориметрии

Количественный уровень биологически активных молекул (ростовых факторов/хемокинов/цитокинов) оценивали в супернатантах ММСК. Анализ проводили методом проточной флуориметрии, двухлучевым лазерным автоматическим анализатором (Bio-Plex® 200 Systems, «Bio-Rad», США), используя коммерческие тест-системы (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay, «Bio-Rad», США).

Метод основан на способности антител на поверхности магнитных гранул (микрофер) связываться с исследуемыми молекулами. Интенсивность люминесценции антител пропорциональна количеству поглощённого света, при воздействии лазера. Все микроферы в комплексе с антителом и исследуемой молекулой в камере анализатора Lumineх подвергаются воздействию двух лазеров с разной длиной волны. Флюорофоры испускают сигналы, которые регистрируются системой датчиков на приборе. В процессе анализа отмечают тип микроферы и наличие (концентрация) искомого анализа на соответствующем типе

частиц. Основные этапы анализа представлены на **рисунке 5**. Оценку концентрации исследуемых нами факторов (IFN α , IFN γ , IL-6, IP-10, TNF α , RANTES, TRAIL, LIF, SCF и G-CSF), осуществляли в супернатантах 14-дневных клеточных культур ММСК, полученных при центрифугировании в следующих условиях: 500 об/мин в течение 10 минут (при 4 °С). Далее образцы обрабатывали в соответствии с инструкцией производителя тест-систем.

На первом этапе работы в специализированные 96-луночные планшеты Bio-Plex добавили по 0,05 мл раствора микросфер. Микросферы затем подвергались отмывке в промывочной станции Bio-PlexPro™ WashStations, («Bio-Rad», США). После подготовки микросфер в планшет вносили по 0,05 мл исследуемых, стандартных образцов и раствора бланка, в соответствии с протоколом производителя. Для эффективного связывания всех компонентов инкубацию проводили 30 минут в условиях полной темноты, при комнатной температуре и встряхивании 300 об/мин. Далее, к объему 3-х кратного буфера, используемого для отмывки, добавляли 25 мкл специфических антител. По истечению второй инкубации образцы в планшете трижды отмывались и разбавлялись в 0,1 мл стрептавидина–PE. Связывание стрептавидина с биотинилированными антителами в пробах проходило 10 минут в темноте при встряхивании 300 об/мин и комнатной температуре.

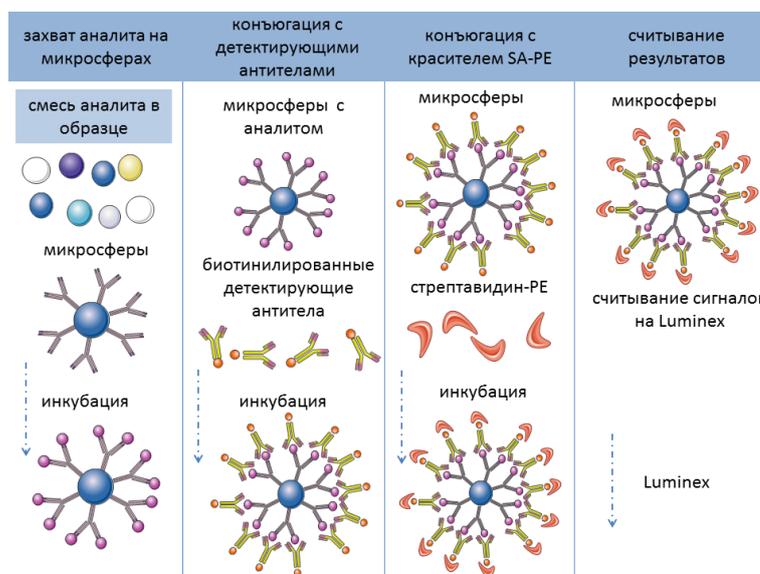


Рисунок 5. Основные этапы мультиплексного анализа.

После инкубации пробы отмывались три раза, разбавлялись 0,125 мл специальным буфером. На последнем этапе планшеты с пробами 30 секунд встряхивали 1100 об/мин и затем устанавливали в платформу Bio-Plex.

Анализ данных проводили, используя автоматический фотометр Bio-Plex (Bio-Plex® 200 Systems, «Bio-Rad», США) и программного обеспечения Bio-PlexManager («Bio-Rad», США). В соответствии с инструкцией производителя по стандартной кривой набора (определяемый динамический диапазон составлял 2-32 000 пг/мл) определяли концентрацию исследуемых молекул. Нижняя граница чувствительности метода составляет <2 пг/мл. В связи с этим, по результатам анализа и статистической обработке количества содержания целевых веществ, значения ниже порога чувствительности метода приравнивались к 1 пг/мл. *Результаты выражали в пг/мл.*

2.6. Оценка концентрации остеокальцина в супернатантах клеточных культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека (на 21 сутки культивирования) методом иммуноферментного анализа

Количественное определение содержания остеокальцина, маркера функциональной активности остеобластов, в супернатантах 21-дневных клеточных культур ММСК проводили методом иммуноферментного анализа, с использованием коммерческого набора N-MID Osteocalcin ELISA.

Принцип работы тест-системы N-MID Osteocalcin ELISA («IDS», Великобритания) основан на использовании двух высоко специфичных моноклональных антител к остеокальцину человека. Один вид антител распознает среднюю часть (аминокислотный фрагмент 20-29) полипептида, захватывая его, а другой, конъюгированный с пероксидазой, распознает N-терминальную область (аминокислотные остатки 10-16). Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически

Для определения количественного уровня остеокальцина, в соответствии с инструкцией производителя и протоколом исследования, в соответствующие лунки планшета вносили по 20 мкл стандартных образцов, контрольных образцов и

образцов супернатанта клеточных культур ММСК, после чего в каждую лунку добавляли по 150 мкл раствора антител. Планшет инкубировали в течение 120 мин при комнатной температуре и постоянном встряхивании (300 об/мин). Несвязавшийся материал удаляли пятикратным циклом отмывки на автоматическом промывателе планшетов. Далее, в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали планшет в течение 15 мин при комнатной температуре и постоянном встряхивании (300 об/мин). По истечении 15 минут в каждую лунку добавляли стоп-реагент (раствор 0,5 М серной кислоты) для остановки реакции.

Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили согласно протоколу, рекомендуемому производителем тест-системы (N-MID Osteocalcin ELISA, «IDS», Великобритания) на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа «Лазурит» («Dynex Technologies», США). Оценка оптической плотности осуществлялась при длине волны 450 нм с референсной длиной волны - 650 нм. Результаты выражали в нг/мл.

2.7. Определение общей площади трёхмерных островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) и числа клеток с морфологией кроветворных в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека методом компьютерной морфометрии

Для выявления направленной остеогенной дифференцировки в экспериментальных культурах (**2D модель, 2D_остео модель, 3D модель**), выделенные ММСК человека ($0,05 \times 10^6$ кл/лун для 12 лун. планшетов, $0,1 \times 10^6$ кл/лун для 6 лун. планшетов), культивировали при 37 °С, 100 % влажности и 5% CO₂, 21 день, при смене полной культуральной среды каждые 3-4 дня (1,5 мл для 12 лун. планшетов; 2 мл для 6 лун. планшетов), состоящей из α MEM («Sigma-Aldrich», США), содержащей: 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США), 280 мг/л L-глутамин («Sigma-Aldrich», США), пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) («Gibco Life Technologies», США), каждые 3-4 дня.

В качестве среды для положительного контроля остеодифференцировки использовали готовую остеоиндуктивную среду StemPro Osteogenesis Differentiation Kit («Thermo Fisher Scientific», США) (**2D-остео**); для исследования остеointеграции объекта исследования и отрицательного контроля дифференцировки (культура ММСК без добавления образцов для испытаний – **2D модель**) использовали ПКС с описанным выше составом.

Идентификацию участков минерализации в культурах ММСК с образцами проводили через 21 сутки методом окрашивания с использованием красителя 2% водного раствора ализарина красного («Sigma-Aldrich», США), по стандартной методике (см. пп. 2.2.4.).

Для получения микрофотографий окрашенных культур использовался микроскоп лабораторный биологический для фазового контраста, флуоресценции и документирования IX 51 S8F в комплекте с программным обеспечением («Olympus Corporation», Филиппины), в режиме фазового контраста (**рисунок 6**). Светочувствительность камеры на микроскопе была одинакова на протяжении всего эксперимента. Морфометрическое исследование площади окрашенных клеток проводили с использованием инструментов компьютерной программы Adobe Photoshop CS6 (Adobe Inc., США) согласно алгоритму, представленному в руководствах [Новицкий В.В. et al., 2004; Автандилов Г.Г., 2006].

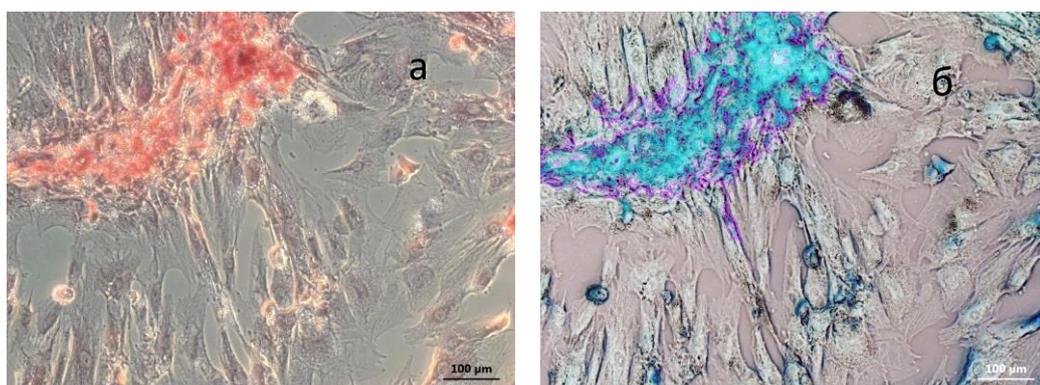


Рисунок 6. Микрофотографии 3D культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека на 21 сутки культивирования, при окрашивании ализариновым красным участков минерализации межклеточного вещества: (а) - нативная микрофотография, (б) инверсированная микрофотография, с обведённой лиловой линией очагов/узелков трехмерных минерализатов.

Линейка в углу снимков соответствует 100 мкм.

Очаги минерализации были выделены с использованием инструмента «Волшебная палочка», для каждого центра минерализации индивидуально подбирался допуск инструмента на основании цветовой характеристики минерализата (**рисунок 6**). После проведения измерений, площадь каждого трехмерного очага/узелка минерализата заносилась в таблицу, а его границы окрашивались в зеленый/лиловый цвет, для визуализации обведённых участков. Так как съёмка производилась на объективах с различным увеличением, нами были введены поправочные коэффициенты для пересчета площади из пикселей в квадратные микрометры. Результаты общей площади минерализации трёхмерных очагов/узелков выражали в $\text{мм}^2 / \text{см}^2$ поверхности лунки планшета (площадь поверхности лунки планшета составляет 4 см^2) (**рисунок 6**).

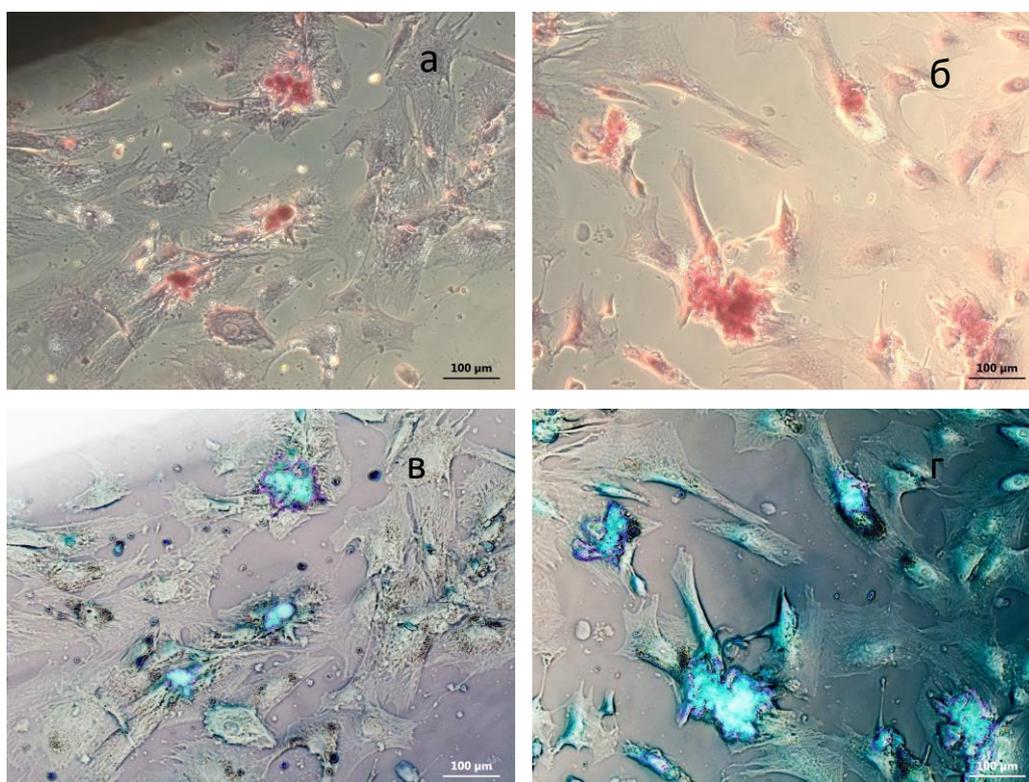


Рисунок 7. Микрофотографии 3D культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека на 21 сутки культивирования, при окрашивании ализариновым красным участков минерализации межклеточного вещества: (а, б) - нативные микрофотографии, (в, г) инверсированные микрофотографии, с обведённой лиловой линией очагов/узелков трехмерных минерализатов. На всех фото определяются клетки с морфологией кроветворных (округлые, ядерные, размер 7-15 мкм). Линейка в углу снимков соответствует 100 мкм.

Число клеток с морфологией кроветворных на микрофотографиях (размер фото - 1,51 мм²) окрашенных культур ММСК подсчитывали на поверхности лунки планшета на пластике, около образовавшихся трёхмерных очагов/узелков минерализации (очаги с окраской ализариновым красным). Для оптимизации подсчёта и представления полученных данных, вводили поправочные коэффициенты; результаты выражали в виде количества клеток на мм² поверхности площади лунки планшета (**рисунок 7**).

2.8. Методы статистического анализа данных

Статистическая обработка полученных результатов была проведена с использованием методов статистического описания, а также методов проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах IBM SPSS Statistics 20. Для анализа исследуемых выборок данных применяли гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25%-й (Q1) и 75%-й (Q3) квантили. Для оценки статистической достоверности различий между исследуемыми выборками, которые не подчинялись закону нормального распределения, использовали критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Для выявления взаимосвязей между исследуемыми значениями проводили корреляционный и регрессионный анализы путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) и коэффициента регрессии (r²) [Кремер Н.Ш., 2004]. Различия считали статистически значимыми на уровне значимости $p < 0,05$. Статистическая обработка данных ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени осуществлялась с помощью специализированной программы REST 2009 v. 2.0.12.

Схема дизайна исследования представлена на **рисунке 8**.

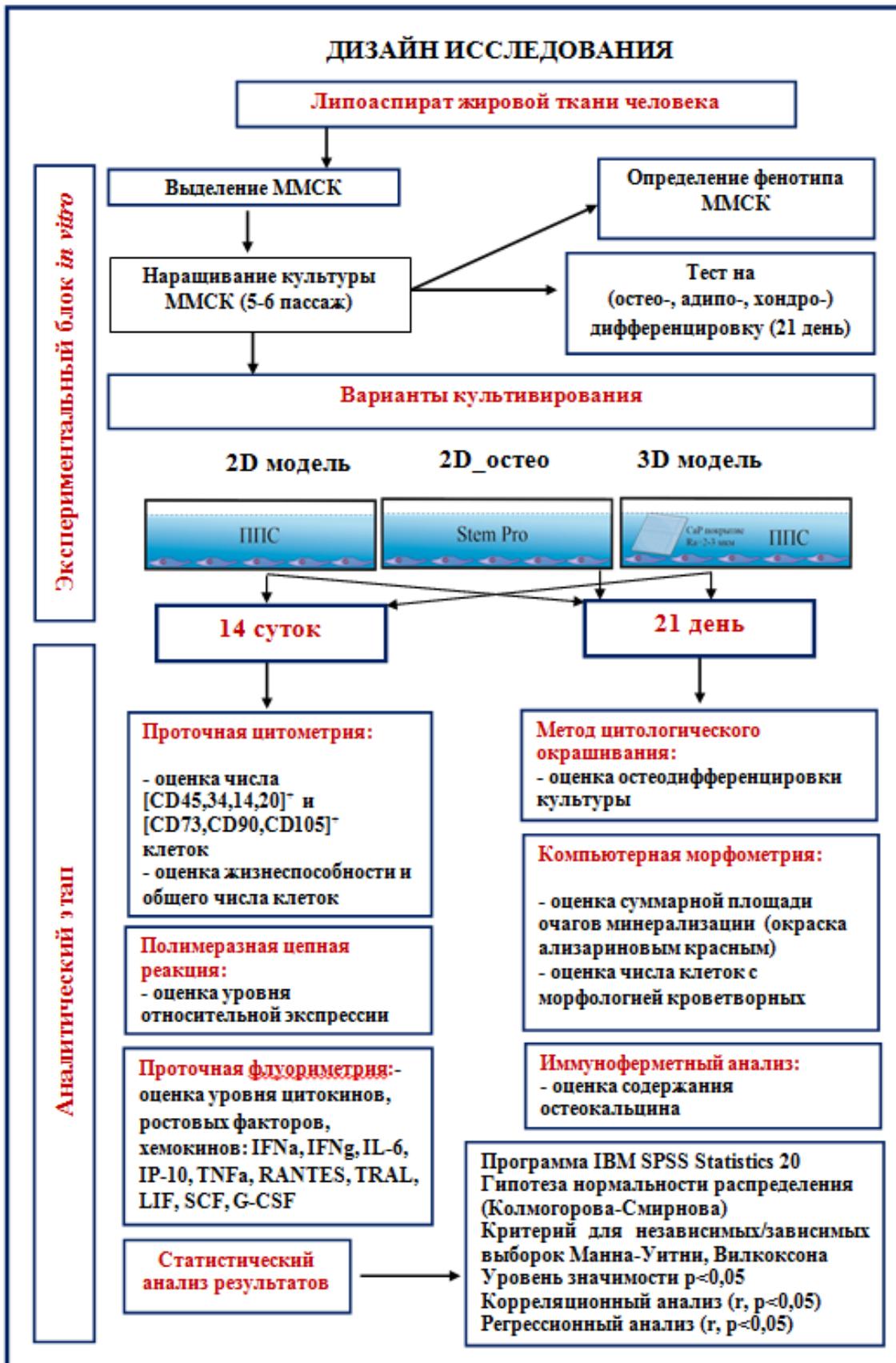


Рисунок 8. Схема дизайна исследования

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.2. Оценка числа живых и мёртвых форм мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования (14 дней) с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием (Ra=2,0-3,0 мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (срок культивирования - 14 дней)

Согласно данным, представленным в **таблице 1**, в 2D модели культивирования ММСК (контроль без образцов), через 14 дней инкубации, число жизнеспособных клеток в культуре составило 92,52 (91,11 – 95,29)%, содержание мертвых форм ММСК было равным 7,61 (4,96-10,04)%, соответственно (**таблица 1**).

В экспериментальных 3D моделях дистантного сокультивирования ММСК, все изучаемые параметры были сопоставимы с аналогичными значениями, полученными при анализе 2D культур ММСК (**таблица 1**).

Таблица 1. Относительное (%) содержание живых и мертвых форм мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования - 14 дней), Me (Q₁ - Q₃)

Показатели	Варианты культивирования ММСК	
	2D модель n=6	3D модель n=8
Число живых клеток, %	92,52 (91,11 – 95,29)	91,68 (91,45-93,21)
Число мертвых клеток, %	7,61 (4,96-10,04)	8,55 (4,98-10,21)

Примечание: здесь и в таблицах: 2,3,4,5,6,7 n – число наблюдений (образцов) в каждой группе исследования

3.3. Оценка фенотипических параметров в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (срок культивирования - 14 дней)

По истечении 14 суток культивирования ММСК, культивируемые на пластике, презентировали на мембранной поверхности маркеры CD73, CD90 и CD105, характерные для ММСК, на уровне более 95%. В частности, число [CD73]⁺ клеток составило 95,83 (94,91-96,11)%, содержание [CD90]⁺ клеток было равным 98,65 (98,52-98,81)%, а уровень [CD105]⁺ клеток составил 98,92 (98,77-99,11)% (таблица 2).

В экспериментальной 3D культуре, при дистантном сокультивировании ММСК с искусственными 3D матриксами ($Ra=2,0-3,0$ мкм), число клеток с иммунофенотипическими признаками ММСК, статистически значимо снижалось. Так, содержание [CD73]⁺ было равным 93,21 (93,11-94,81) %, число [CD90]⁺ клеток составило 97,41 (96,65-97,79)%, а количество [CD105]⁺ клеток - 97,23 (97,03-98,35)% (таблица 2).

Содержание кроветворных клеток, экспрессирующих маркеры [CD45,34,14,20]⁺ в контрольной 2D культуре ММСК на пластике, по истечении 14 суток культивирования, составило 0,28 (0,26-0,38) %. При оценке экспериментальной 3D культуры ММСК было выявлено статистически значимое увеличение (в среднем, в 2,8 раза) числа [CD45,34,14,20]⁺ клеток по сравнению со значениями 2D культуры (таблица 2).

Оценка корреляционных взаимосвязей маркеров, характеризующих иммунофенотип ММСК с возрастающей долей гемопоэтических стволовых клеток позволила выявить обратную связь числа [CD45,34,14,20]⁺ клеток с содержанием [CD90]⁺ и [CD73]⁺ клеток ($r=-0,80$; $r=-0,76$; $p<0,05$, соответственно), что может свидетельствовать о перераспределении популяций гемопоэтических и стромальных клеток при сокультивировании с трехмерными матриксами с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (таблица 8).

Таблица 2. Фенотипические характеристики культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования - 14 дней), Ме (Q₁ - Q₃)

Показатели	Варианты культивирования ММСК	
	2D модель n=6	3D модель n=8
[CD45,34,14,20] ⁺	0,28 (0,26-0,38)	0,78 (0,60-0,91) <i>PI < 0,05</i>
[CD73] ⁺	95,83 (94,91-96,11)	93,21 (93,11-94,81) <i>PI < 0,05</i>
[CD90] ⁺	98,65 (98,52-98,81)	97,41 (96,65-97,79) <i>PI < 0,05</i>
[CD105] ⁺	98,92 (98,77-99,11)	97,23 (97,03-98,35)

Примечание: здесь и в таблицах 3,4,5,6,7 - P1 - статистические различия с соответствующей группой (2D модель)

3.3. Исследование концентрации цитокинов в супернатантах культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (срок культивирования - 14 дней)

Согласно результатам проведенного нами мультиплексного анализа, представленного в таблицах 3 и 4, содержание провоспалительных факторов в супернатантах 14-дневных 2D культур ММСК на пластике было следующим:

IFNa - 18,56 (15,91-19,41) пг/мл;

IFNg - 65,46 (52,69-157,6) пг/мл;

IL-6 - 484,83 (459,375-510,915) пг/мл;

IP-10 - 19,25 (16,595-48,46) пг/мл;

TNFa - 15,53 (10,33 – 32,12) пг/мл (таблица 3).

Концентрация хемокина **RANTES** в 2D культурах ММСК была равной 11,66 (4,09 – 15,32) пг/мл, а уровень проапоптотического фактора **TRAIL** - 4,37 (3,04-5,37) пг/мл (таблица 3).

По истечении 14 суток культивирования, в супернатантах культур, при дистантном сокультивировании ММСК с трехмерными матриксами ($Ra=2,0-3,0$ мкм), было выявлено достоверное снижение концентрации провоспалительных факторов (таблица 3).

Так, содержание IFNg в супернатантах 3D культур ММСК снижалось в 2,3 раза по сравнению с контрольными значениями 2D культуры и составило - 28,07 (20,6-35,07) пг/мл ($p<0,05$). Концентрация IFNa в экспериментальных 3D культурах ММСК, напротив, была сопоставима с контрольными значениями и была равной - 18,56 (15,91-19,41) пг/мл (таблица 3).

Уровень IL-6 в супернатантах экспериментальных 3D культур ММСК составил 380,03 (286,87-439,16) пг/мл, что было достоверно ниже (на 20%, $p<0,05$) относительно аналогичных значений контрольных 2D культур на пластике (таблица 3).

Таблица 3. Содержание факторов с провоспалительной (IFNa, IFNg, IL-6, IP-10, TNFa), хемоаттрактантной (RANTES) и проапоптотической (TRAIL) активностью в супернатантах культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования - 14 дней), Ме (Q₁ - Q₃)

Показатели	Варианты культивирования ММСК	
	2D модель n=6	3D модель n=8
IFNa, пг/мл	18,56 (15,91-19,41)	17,1 (17,1-18,41)
IFNg, пг/мл	65,46 (52,69-157,6)	28,07 (20,6-35,07) P1<0,05
IL-6, пг/мл	484,83 (459,375-510,915)	380,03 (286,87-439,16) P1<0,05
IP-10, пг/мл	19,25 (16,595-48,46)	8,23* (7,21-9,33) P1<0,05
TNFa, пг/мл	15,53 (10,33 – 32,12)	3,94 (1,99 - 4,82) P1<0,05
TRAIL, пг/мл	4,37 (3,04-5,37)	2,71 (2,49-2,81) P1<0,05
RANTES, пг/мл	11,66 (4,09 – 15,32)	32,82 (18,35 – 75,15) P1<0,05

Концентрация IP-10 в супернатантах экспериментальных 3D культур ММСК составила 8,23 (7,21-9,33) пг/мл, что было также статистически ниже (в 2,4 раза, $p < 0,05$) уровня контрольных значений, полученных в 2D модели культивирования ММСК на пластике (**таблица 3**).

Уровень провоспалительного медиатора TNF α , определяемый в супернатантах экспериментальных 3D культур ММСК, также был достоверно ниже (в 3,75 раза, $p < 0,05$) значений, полученных при исследовании контрольных 2D культур ММСК на пластике и составил 3,94 (1,99 - 4,82) пг/мл (**таблица 3**).

Концентрация проапоптотического фактора TRAIL в экспериментальных культурах ММСК, при их сокультивировании с трехмерными матриксами с КФ покрытием, была ниже в 2 раза аналогичных значений, полученных в 2D культурах ММСК на пластике и составила 2,71 (2,49-2,81) пг/мл ($p < 0,05$).

Интересным явился факт повышения (в 2,9 раз) концентрации хемокина RANTES в супернатантах экспериментальных 3D культур ММСК в сравнении с контрольными значениями ($p < 0,05$) (**таблица 3**).

Содержание фактора LIF в супернатантах экспериментальных 3D-культур ММСК после 14 суток культивирования было равным 20,21 (16,35-21,17) пг/мл, что оказалось достоверно выше значений (в 1,4 раза), полученных при оценке 2D культур на пластике (**таблица 4**).

Уровень SCF в экспериментальных 3D культурах ММСК на 14 день культивирования, превышал более чем в 3 раза аналогичные значения, полученные при оценке 2D культур ММСК и составил 11,27 (4,68-11,3) пг/мл (**таблица 4**).

По истечении 14 суток культивирования, содержание G-CSF в экспериментальных 3D-культурах ММСК было выше (в 1,6 раза, $p < 0,05$) в сравнении с аналогичными цифрами, полученными в 2D модели на пластике (**таблица 4**).

Нами были обнаружены следующие корреляции в экспериментальных 3D культурах ММСК между числом **[CD45,34,14,20]⁺** клеток и **IL-6** ($r=0,71$, $p < 0,05$), **RANTES** ($r=0,74$, $p < 0,05$), **LIF** ($r=0,81$, $p < 0,05$), **SCF** ($r=0,75$, $p < 0,05$), **G-CSF** ($r=0,68$, $p < 0,05$), **TNF α** ($r=-0,83$, $p < 0,05$), **IP-10** ($r=-0,68$, $p < 0,05$); **RANTES** с числом

мертвых клеток ($r=-0,82$, $p<0,05$); **IL-6 с TRAL** ($r=-0,63$, $p<0,05$) и **числом живых клеток** ($r=0,72$, $p<0,05$) (таблица 8).

Таблица 4. Содержание гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF) в супернатантах культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования - 14 дней), Me (Q₁ - Q₃)

Показатели	Варианты культивирования ММСК	
	2D модель n=6	3D модель n=8
LIF, пг/мл	14,3 (8,71-16,23)	20,21 (16,35-21,17) P1<0,05
SCF, пг/мл	3,92 (3,61-4,66)	11,27 (4,68-11,3) P1<0,05
G-CSF, пг/мл	15,83 (14,47-63,61)	24,39 (15,82-36,31) P1<0,05

3.6. Оценка относительной экспрессии мРНК гена щелочной фосфатазы (ALPL) в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием (Ra=2,0-3,0 мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (срок культивирования - 14 дней)

Сокультивирование (в течение 14 дней) ММСК с трехмерным матриксом с КФ покрытием ($R_a=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань, приводило к значимому росту (в 4 раза) экспрессии мРНК гена щелочной фосфатазы (*ALPL*) в 3D культурах клеток, относительно аналогичных результатов, полученных при исследовании 2D культур ММСК на пластике (**рисунок 9**).

В экспериментальных 3D культурах ММСК нами были обнаружены значимые взаимосвязи между уровнем экспрессии гена *ALPL* и числом $[CD105]^+$ ($r=0,76$, $p<0,05$) и $[CD45,34,14,20]^+$ клеток ($r=0,70$, $p<0,05$), *RANTES* ($r=0,72$, $p<0,05$) (**таблица 8**).

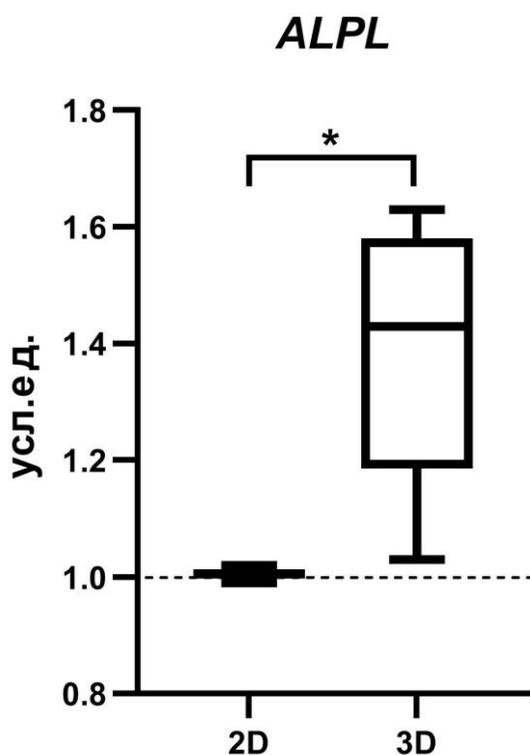


Рисунок 9. Изменение относительного уровня (усл.ед.) транскрипции мРНК гена *ALPL* (щелочная фосфатаза) в культурах жировой ткани человека в условиях сокультивирования *in vitro* с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($R_a=2,0-3,0$ мкм), срок культивирования - 14 дней

3.7. Исследование концентрации остеокальцина в супернатантах культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (срок культивирования - 21 день)

Содержание остеокальцина на 21 сутки в 2D модели культивирования ММСК на пластике составило 12,48 (11,31 - 14,38) нг/мл (таблица 5).

Сравнительный анализ позволил выявить, что в условиях 21 дневного культивирования ММСК с трёхмерным матриксом с КФ покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (3D модель), концентрация остеокальцина в супернатантах культур оказалась статистически значимо выше (в 1,4 раза, $p<0,05$) в сравнении с 2D контролем, но не достигала таковой в 2D модели _остео, при культивировании ММСК в специализированной дифференцировочной остеогенной среде (таблица 5).

Таблица 5. Содержание остеокальцина в супернатантах культур мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования - 14 дней), Ме ($Q_1 - Q_3$)

Показатели	Варианты культивирования ММСК		
	2D модель n=6	2D модель_остео n=6	3D модель n=8
Остеокальцин, нг/мл	12,48 (11,31 - 14,38)	22,45 (20,11 – 25,23) P1<0,05	16,33 (13,21 – 20,76) P1<0,05 P2<0,05

Примечание: здесь и в таблицах 6, 7 - P1 - статистические различия с группой - 2D модель, P2 - статистические различия с группой - 2D модель_остео.

3.6. Оценка общей площади островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток в условиях их дистантного сокультивирования с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием (Ra=2,0-3,0 мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (срок культивирования - 21 день)

Для определения *in vitro* способности образцов трехмерных матриксов с КФ покрытием к остеоинтеграции, проводили цифровую съёмку культур ММСК с окрашенными участками минерализации межклеточного вещества на инверторном микроскопе с цветной цифровой камерой в комплекте с программным обеспечением для обработки изображений. Результаты представлены в **таблице 6** и **на рисунке 10**.

Таблица 6. Суммарная площадь островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования – 21 день), Me (Q₁ - Q₃)

Показатели	Варианты культивирования ММСК		
	2D модель n=6 n1=35	2D модель_остео n=6 n1=35	3D модель n=8 n1=205
Суммарная площадь островков минерализации (при окраске ализариновым красным), мм ² / см ² поверхности лунки	0 (0 - 0,15)	3,95 (1,86 – 6,61) P1<0,001	2,74 (1,75 – 4,77) P1<0,001 P2<0,05

Примечание: n1 - число снимков

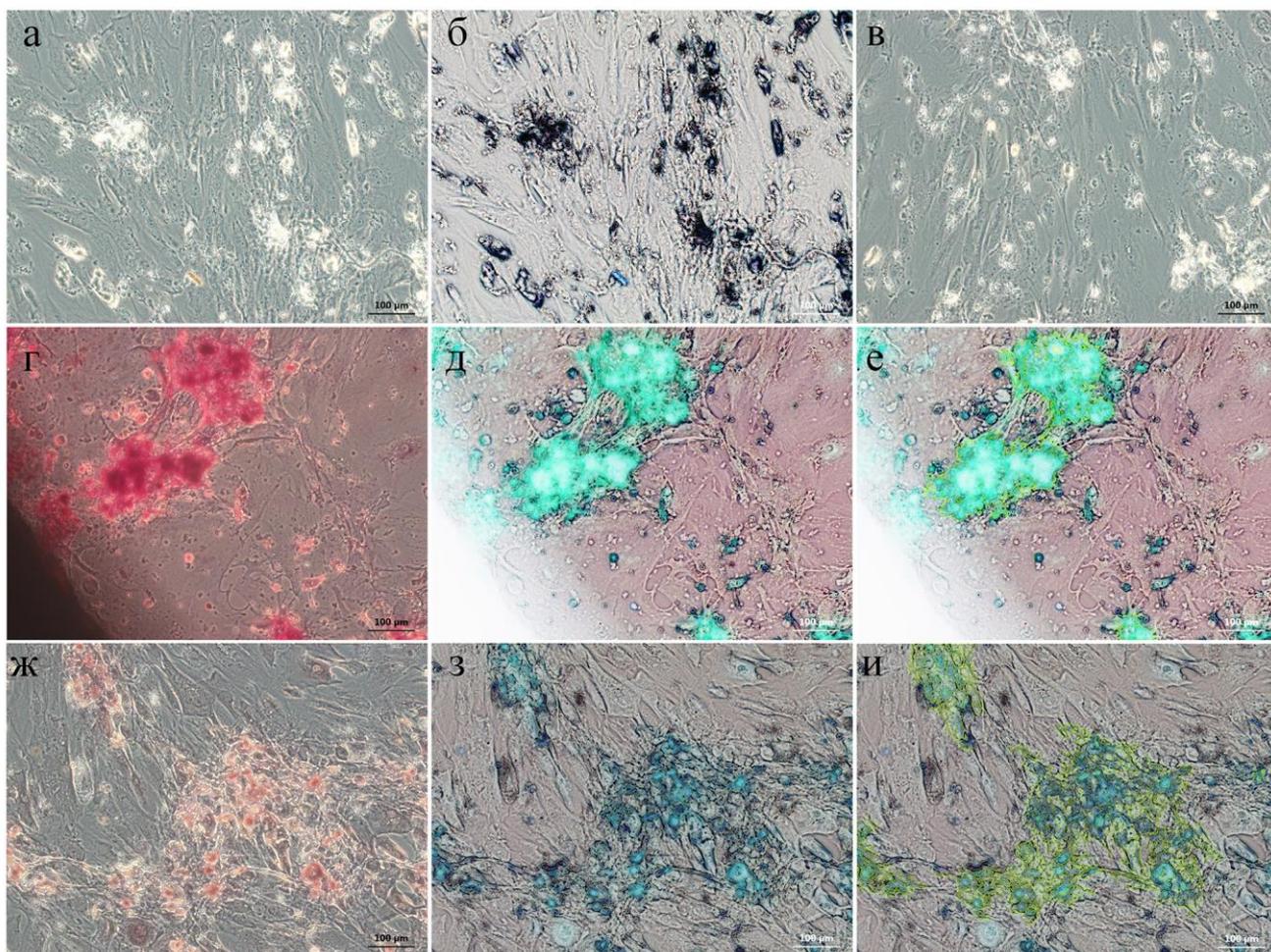


Рисунок 10. Микрофотографии культур жировой ткани человека на 21 сутки культивирования, при сравнительном окрашивании ализариновым красным участков минерализации межклеточного вещества:

а,б,в - 2D культура клеток (контроль);

г,д,е - 3D культура клеток в присутствии матриксов с КФ покрытием;

ж,з,и - 2D культура клеток в остеогенной дифференцировочной среде;

(а,в,г,ж) нативные микрофотографии, (б,д,з) инверсированные микрофотографии, (е,и) инверсированные микрофотографии с обведёнными зеленой линией участками минерализатов. Линейка в углу снимков соответствует 100 мкм.

Для идентификации остеоинтеграции клеточной культуры ММСК с объектами исследования делали не менее 25 цифровых фотографий полей зрения с окрашенными участками в каждой лунке, согласно принципам гистоморфометрической оценки [Автандилов Г.Г., 1990].

Анализируя полученные результаты, стоит отметить, что исследуемые нами экспериментальные образцы трёхмерного матрикса с КФ покрытием обладали остеоиндуктивным потенциалом в отношении клеточных культур

ММСК, по сравнению с 2D контролем на пластике (2,74 (1,75 – 4,77) против 0 (0 – 0,15) мм² / см² лунки в контроле) (**таблица 6, рисунок 10**).

Однако в экспериментальных 3D культурах ММСК значения общей площади островков/узелков минерализации были ниже аналогичных показателей, полученных в модели 2D_остео (3,95 (1,86 – 6,61) мм² / см² лунки).

Важно отметить отсутствие островков минерализации в контрольных культурах во всех направлениях поля зрения (**таблица 6, рисунок 10**).

3.7. Оценка числа клеток с морфологией кроветворных в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в условиях их дистантного сокультивирования с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием (Ra=2,0-3,0 мкм), имитирующим регенерирующую костную ткань (срок культивирования - 21 день)

При исследовании фиксированных препаратов культур ММСК на предмет выявления содержания клеток с морфологией кроветворных в поле зрения, было выявлено, что число кроветворных клеток в 2D модели на пластике составило 24,51 (19,2 – 26,8) в расчёте на мм² снимка поверхности лунки (**таблица 7**).

Морфометрический анализ экспериментальной 3D культуры ММСК, в присутствии матриксов с КФ покрытием, позволил выявить достоверное увеличение количества кроветворных клеток по сравнению с аналогичными значениями 2D модели и 2D_остео модели (в среднем, в 3,7 раза) (**таблица 7**). В условиях дистанционного сокультивирования ММСК с трехмерным матриксом нами были обнаружены взаимосвязи между площадью очагов/узелков минерализации с числом кроветворных клеток ($r=0,89$, $p<0,05$), остеокальцином ($r=0,87$, $p<0,05$); числа ГСК с остеокальцином ($r=0,90$, $p<0,05$).

Таблица 7. Содержание клеток с морфологией кроветворных в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования – 21 день), Ме (Q₁ - Q₃)

Показатели	Варианты культивирования ММСК		
	2D модель n=6 n1=35	2D модель_остео n=6 n1=35	3D модель n=8 n1=205
Число клеток с морфологией кроветворных на мм ² снимка поверхности лунок планшета	24,51 (19,2 – 26,8)	27,11 (21,34 – 34,50)	100,5 (89,07-110,93) P1 < 0,001 P2<0,05

Примечание: n1 - число снимков

3.8. Корреляционные взаимосвязи, выявляемые между исследуемыми параметрами

Корреляционные взаимосвязи, выявляемые между исследуемыми параметрами в экспериментальных 3D культурах ММСК систематизированы и представлены в **таблице 8.**

Таблица 8. Корреляционные взаимосвязи между исследуемыми параметрами в экспериментальных 3D культурах жировой ткани человека

[CD45,34,14,20]⁺	CD73⁺ (r=-0,76, p<0,05)
	CD90⁺ (r=-0,80, p<0,05)
	ALPL (r=0,70, p<0,05)
	IL-6 (r=0,71, p<0,05)
	RANTES (r=0,74, p<0,05)
	LIF (r=0,81, p<0,05)
	SCF (r=0,75, p<0,05)
	G-CSF (r=0,68, p<0,05)
	TNFα (r=-0,83, p<0,05)
	IP-10 (r=-0,68, p<0,05)
ALPL	CD105⁺ (r=0,76, p<0,05)
	RANTES (r=0,72, p<0,05)
	[CD45,34,14,20]⁺ (r=0,70, p<0,05)
Число клеток с морфологией кроветворных (21 сутки)	Остеокальцин (r=0,90, p<0,05)
	Площадь очагов минерализации (r=0,89, p<0,05)
Площадь очагов минерализации	Остеокальцин (r=0,87, p<0,05)
RANTES	Число мертвых клеток (r=-0,82, p<0,05)

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для интерпретации ключевых аспектов гомеостаза ГСК и последующего выбора программы их дифференциации в эту или иную линию клеток, Schofield R. (1978) выдвинул гипотезу о гемопозитической нише (специализированное микроокружение) [Schofield R., 1978]. Работа Шофилда дала начало 30 годам исследований, посвящённым гипотетическим моделям и различным аспектам функциональной ниши ГСК и их иерархии. Обнаружение тесных контактов между ГСК и остеобластами, расположенными в эндосте и адвентициальными клетками кровеносных сосудов, совершило научный прорыв в данной области, тогда как существование остеобластных и сосудистых ниш для ГСК было постулировано с 2003 года [Khlusov I.A. et al., 2018].

Дизайн искусственных материалов, способных к бионическому воспроизведению клеточного и тканевого микроокружения, основывается на идеях и элементах, заимствования у природы, является основным направлением в развитии технологии медицинских материалов и тканевой биоинженерии. Технология скаффолда - экспериментальный подход к поиску ниш стволовых клеток. Были предприняты попытки моделирования микротерриторий (ниш) для ГСК и исследовано поведение клеток в таких структурах. Однако, основные гуморальные и клеточные факторы, участвующие в создании микротерриторий стволовых клеток, остаются неизвестными.

Установлено, что вовремя ремоделирования костной ткани *in vivo*, стромальные предшественники колонизируют чашевидные углубления до 40 мкм в трабекулярной кости, образованные остеокластами, и дифференцируются в остеобласты, активно синтезирующие костную матрицу [Meirelles L.D.S. et al., 2006]. Наиболее распространённой стратегией дифференциации ММСК в остеобласты является использование комбинации факторов роста или биохимических сигналов [Meirelles L.D.S. et al., 2006]. В то же время, исследования показали, что топография ЕСМ сама по себе может стимулировать или усиливать дифференцировку ММСК [Khlusov I.A. et al., 2013].

Как уже упоминалось ранее, остеобластные ниши ГСК, организуясь в тесной кооперации ММСК и остеобластов, как клеток специализированного

микроокружения (ниш) кроветворных клеток, располагаются в эндосте кости [Zhang J. et al., 2003; Khlusov I.A. et al., 2018]. Опираясь на проведённые ранее в нашем коллективе экспериментальные работы, симулировать *in vitro* структурно-функциональное состояние эндоста в различные фазы ремоделирования костной ткани возможно с помощью сокультивирования ММСК на подложках с рельефным кальцийфосфатным (КФ) покрытием [Khlusov I.A. et al., 2018]. Обнаруженный нами усиленный выход остеобластов и кроветворных клеток в экспериментальной трехмерной клеточной культуре ММСК-ЖТ человека, позволил нам сформулировать гипотезу об *in vitro* взаимодействии ММСК, дифференцирующихся остеобластов и ГСК, с образованием остеобластных (эндостальных) кроветворных ниш [Litvinova L.S. et al., 2018]. Однако клеточные, гуморальные и молекулярные механизмы обнаруженного феномена неясны.

Для экспериментального моделирования реакций ММСК человека, в условиях дистантного 3D сокультивирования, были использованы образцы, несущие рельефное кальцийфосфатное (КФ) покрытие, имитирующее регенерирующую костную ткань, с индексом шероховатости поверхности Ra (ГОСТ 2789-73) в диапазоне 2-3 мкм, что соответствует блюдцеобразным углублениям (до 40 мкм), образуемым остеокластами в кости при ее регенерации [Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж., 2000]. В таких условиях возникает возможность *in vitro* симулирования реакции ММСК на контакт с минеральным матриксом кости, в условиях ее ремоделирования.

Минимальными морфологическими критериями принадлежности к ММСК являются: 1) жизнеспособность более 90 % [Bourin P. et al., 2013]; 2) позитивные мембранные маркеры - CD73, CD90 и CD105; негативные мембранные молекулы кроветворных клеток - CD45,34,20,14 [Dominici M. et al., 2006; Bourin P. et al., 2013]; 3) способность прилипать к пластику и дифференцироваться *in vitro* в трех ортодоксальных направлениях: остеогенном, хондрогенном и адипогенном [Dominici M. et al., 2006].

Культура клеток, используемых нами в эксперименте, продемонстрировала жизнеспособность не ниже 91 %; после 21-дневного культивирования в дифференцировочных средах StemPro® Differentiation Kit («Thermo Fisher Scientific»,

США) клетки показывали положительную окраску на ализариновый красный (остеобласты), альциановый синий (хондробласты) и масляный красный (адипоциты) (рисунок 3). В стандартной культуральной среде без специализированных добавок, более 95% прилипающих клеток экспрессировали маркеры CD73, CD90 и CD105, при низкой презентации CD45,34,20,14 (менее 0,1%) (рисунок 4). Таким образом, использованная в нашем эксперименте культура мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток соответствовала морфологическим критериям ММСК.

В проведённом нами исследовании, направленном на оценку функциональной роли ММСК в условиях *in vitro* моделирования экспериментальной системы "регенерирующая кость/кровообразное микроокружение", было выявлено, что присутствие искусственных трехмерных матриц (Ra=2,0-3,0 мкм) с КФ покрытием в среде культивирования ММСК, потенцирует увеличение (в 2,5 раза) содержания клеток с иммунофенотипом [CD45,34,14,20]⁺, по сравнению с контрольными 2D-культурами ММСК (на 14 сутки), на фоне статистически значимого снижения числа клеток, презентующих мембранные дифференцировочные молекулы CD73, CD90 и в меньшей степени, CD105 (таблица 4).

Полученные нами экспериментальные данные убедительно демонстрируют, что изменение экспрессии молекул CD90, CD73 и CD105 на клеточной мембране ММСК, может играть решающую роль в модуляции дифференцировочного потенциала ММСК в сторону остеобластов.

CD90, также известный как антиген 1 клеток тимуса (Thy-1) – один из основных классических иммунофенотипических маркеров ММСК [Shin E. Y. et al., 2018; Netsch P. et al., 2018; Saalbach A., Anderegg U., 2019]. Moraes D.A. et al. (2016) показал, что снижение экспрессии CD90 ведет к более эффективной остеогенной дифференцировке ММСК; исследователи предполагают, что нокдаун CD90 может инициировать изменения в степени стволовости ММСК в сторону состояния, более восприимчивого к дифференцировке [Moraes D.A. et al., 2016].

Презентация молекулы CD73 на клеточной мембране регулируется передачей сигналов Wnt-β-катенина - одним из основных путей гомеостаза костной

ткани [Szychala J., Kitajewski J., 2004]. CD73 выполняет регуляторную функцию по контролю хондрогенной и остеогенной дифференцировки ММСК, осуществляя возможное переключение этих сигнальных линий [Takedachi M. et al., 2012; Ode A. et al., 2013].

В свою очередь, молекула CD105 (эндоглин), ещё один маркер мезенхимальных стволовых клеток, представляет собой трансмембранный гликопротеин, один из корецепторов трансформирующего фактора роста β (TGF- β) [Kasprzak A., Adamek A., 2018; Shi D. et al., 2019; Brum S.T. et al., 2019]. Установлено, что CD105 взаимодействует с рецепторами TGF-бета I и TGF-бета III, а также активирует экспрессию морфогенетического белка кости (BMP)-2 и участвует в ангиогенезе, через фактор, индуцируемый гипоксией 1 альфа (HIF 1a) [Kauer J. et al., 2019].

Выявленная нами обратная корреляционная зависимость между содержанием клеток с фенотипом гемопоэтических [CD45,34,14,20]⁺ с числом клеток, позитивных по маркерам: CD90 ($r = - 0,80$; $p < 0,002$) и CD73 ($r = - 0,76$; $p < 0,004$), может свидетельствовать о сопряжённости процессов, происходящих в популяциях кроветворных и стромальных клеток, обусловленных дистантным (через продукты биодegradации) влиянием искусственного КФ матрикса.

В пользу дифференцировки ММСК в остеобласты также свидетельствует выявленный нами рост (на 40% относительно модели 2D-культивирования ММСК) экспрессии мРНК гена щелочной фосфатазы (*ALPL*) в 14-дневных культурах ММСК, в условиях их сокультивирования с матриксами, несущими КФ покрытие (рисунок 9).

Экспрессия гена *ALPL* относится к ранним стадиям остеогенеза [Kim I.S. et al., 2008]. Активность ЩФ необходима для создания щелочного микроокружения, для последующей минерализации внеклеточного матрикса [Zheng, J. et al., 2018] и проявляется к 7-14 дню после контакта с остеогенными скаффолдами [Tian T. et al., 2019]. Одними из индукторов экспрессии гена *ALPL* являются ионы Ca^{2+} , образующиеся при деградации биоматериала [Tian T. et al., 2019] и запускающие дифференцировку ММСК в остеобласты через экспрессию кальций-связывающих протеинов [Carlier A. et al., 2011].

Обнаруженная нами ассоциация между уровнем экспрессии гена *ALPL* и числом клеток, несущих мембранный рецептор CD105 ($r=0,76$, $p<0,05$), может быть интерпретирована тем, что молекула CD105, эндоглин, активирует экспрессию морфогенетического белка кости BMP-2, играющего ключевую роль в дифференцировке остеобластов [Fathilah S.N. et al., 2013], способствуя, в том числе, увеличению активности *ALPL* [Wu S. et al., 2018]. В свою очередь, рост уровня экспрессии мРНК гена *ALPL* обеспечивает присутствие в клеточном микроокружении свободных неорганических фосфатов, которые ассоциируют с кальцием с образованием минерального гидроксиапатита в кости. Hrubí E. и соавт. (2018) убедительно доказали, что уровень экспрессии эндогенного BMP-2 имеет прямую корреляционную взаимосвязь с активацией ЩФ, за счёт инициации передачи сигналов через ERK и цАМФ / протеинкиназу неорганическими фосфатами [Hrubí E. et al., 2018]. Таким образом, увеличение уровня относительной экспрессии *ALPL* является позитивным предиктором минерализации образующейся ткани [Faia-Torres A.V. et al., 2014].

Интересной, на наш взгляд, оказалась выявленная позитивная взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *ALPL* и числом клеток с фенотипом [CD45,34,14,20]⁺ ($r=0,70$, $p<0,05$) в экспериментальной 3D модели дистантного культивирования ММСК, что может также косвенно указывать на процесс формирования «ниши остеобластов» с созданием гемopoэтического микроокружения.

Известно, что ниши для покоящихся стволовых клеток расположены в гипоксических областях тканей, не богатых сосудистой сетью, таких как трабекулярная зона кости для ГСК [Jang Y.Y., Sharkis S.J., 2007]. Yin T. и Li L. (2006) представили остеобластную нишу как «гипоксическую», для поддержания ГСК в состоянии покоя (замедленный цикл или G0) [Yin T., Li L., 2006]. Тогда как сосудистая ниша («кислородная») поддерживает короткоживущие гемopoэтические клетки / предшественницы стволовых клеток, которые активно пролиферируют, дифференцируются и мобилизуются [Cheshier S.H. et al., 1999].

Регуляция клеточного цикла в нише имеет решающее значение для судьбы ГСК [Suda T., Arai F., Hiraó A., 2005]. Изменение окружающей среды приводит к

переходу между покоящимися и циркулирующими ГСК. В частности, нарушение остеобластической ниши (травма, повреждение и т.п.) индуцирует пролиферацию ГСК и их переход в область сосудистой ниши [Arai F. et al., 2004; He N. et al., 2014; Khlusov I.A. et al., 2018].

Согласно ранее высказанной гипотезе о существовании в рельефе КФ микродуговых покрытий искусственных (технологически созданных) микротерриторий, способствующих дифференцировке ММСК в остеобласты [Khlusov I.A. et al., 2018], мы предположили, что последние, формируя ниши для кроветворных (в том числе, лимфоидных) стволовых клеток, способны управлять их поведением в микротерриториях, посредством клеточных контактов и секретируемых факторов роста [Zhang J. et al., 2003].

Многочисленными исследованиями установлено, что ММСК могут осуществлять регуляцию местных и системных врожденных и адаптивных иммунных реакций, посредством высвобождения различных медиаторов, включая иммуносупрессивные молекулы, факторы роста, экзосомы, хемокины, компоненты комплемента, различные метаболиты и паракринной передачи сигналов [Bernardo M.E., Fibbe W.E., 2013; Czekanska E.M. et al., 2014]. Последняя определяется контактным взаимодействием клеток ниши, влияя на исход клеточной дифференцировки [Rüger V.M. et al., 2018]. В связи с вышесказанным, особый интерес в нашем исследовании представляла оценка секреции ММСК ростовых факторов, сигнальных молекул с про- и противовоспалительным, хемотаксическим действием в остеобластных и сосудистых кроветворных нишах, влияющих на ранние этапы кроветворения и участвующие в жизнедеятельности (самоподдержании, коммитировании, дифференцировке, миграции) ГСК.

Согласно полученным нами результатам, активность ММСК в отношении секреции сигнальных молекул после 14-суточного культивирования в контрольной 2D культуре ММСК на пластике, была обусловлена ненулевой продукцией фактора стволовых клеток (stem cell factor, SCF), ингибирующего лейкемию фактора (leukemia inhibitory factor, LIF), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), а также плейотропных цитокинов и хемокинов, регулирующих, в том числе, миграцию и активность кроветворных клеток. На наш взгляд, подобный

профиль секретируемых факторов с балансом активаторов клеточной жизнедеятельности и их гибели, может обуславливать наличие кроветворных клеток в 2D культуре ММСК на пластике (таблицы 3,4).

Провоспалительные медиаторы, такие как интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли- α (TNF α), интерферон- γ и α (IFN γ , IFN α), за счет паракринных механизмов, регулируют пролиферацию и дифференцировку ГСК и их клеточных предшественниц [Takizawa H. et al., 2012; Zhao J. L. et al., 2014; Porter S.N. et al., 2016; Smith J.N.P. et al., 2018; Tie R. et al., 2019]. Этот факт имеет логичное объяснение, поскольку ГСК поддерживает иммунные функции на протяжении всей жизни организма, которые зависят от воспалительного стресса, что и объясняет влияние провоспалительных медиаторов на кроветворение [Takizawa H. et al., 2012; Smith J.N.P. et al., 2018]. Недавние исследования убедительно доказывают участие провоспалительных медиаторов также в процессе тканевой регенерации [Tie R. et al., 2019; Piryani S.O. et al., 2019].

Анализируя полученные экспериментальные данные, на 14 сутки культивирования, нами было выявлено статистически значимое снижение (в среднем, в 2,5 раза относительно аналогичных показателей 2D культуры ММСК на пластике) содержания провоспалительных медиаторов (в частности, IFN γ , IL-6, IP-10 и TNF- α , но не IFN- α) в супернатантах клеточных культур ММСК, в условиях их дистантного сокультивирования с 3D матриксами с КФ-покрытиями (таблица 3).

На сегодняшний день, роль TNF α в регуляции биологии ГСК представляется спорной: некоторые исследования показали, что TNF α подавляет функции ГСК, в то время как другие предполагают, что он инициирует их функциональную активность [Pietras E.M., 2017; Chavez J.S., Pietras E.M., 2018]. Установлено, что временное повышение уровней активных форм кислорода (АФК), опосредованное ростом продукции TNF α , является потенциальным механизмом трансформации/дифференцировки ГСК и истощения их нормальных клонов [Pietras E.M., 2017]. Также выявлено, что TNF α , наряду с IFN γ , ингибирует рост ГСК и индуцирует их апоптоз [Baldrige M.T., King K. Y., Goodell M.A., 2011]. Однако относительно недавние исследования показали, что IFN γ обладает способностью регулировать активность клеточного цикла ГСК [Morales-Mantilla

D.E., King K.Y., 2018]. Так, краткосрочные эффекты передачи сигналов IFN- γ характеризуются увеличением пролиферации ГСК, долгосрочные эффекты, напротив, приводят к истощению их пула [Morales-Mantilla D.E., King K.Y., 2018]. При добавлении IFN γ *in vitro* в культуры CD34 клеток человека выявлено увеличение количества жизнеспособных клеток и образование колоний. Обнаружено, что IFN γ стимулирует рост гемопоэтических предшественников крови, но ингибирует рост клеток, происходящих из костного мозга [Baldrige M.T., King K. Y., Goodell M.A., 2011]. Кроме того, передача сигналов IFN- γ может способствовать дифференцировке ГСК за счет самообновления, через подавление экспрессии *Gata2* и *Ets-1* [Morales-Mantilla D.E., King K.Y., 2018]. Таким образом, передача сигналов IFN γ может влиять на гомеостаз ГСК напрямую, изменяя экспрессию генов в ГСК, и косвенно, изменяя регуляторные роли соседних клеток ниши.

Следующий определяемый нами медиатор, IFN- γ индуцируемый белок-10 (IP-10, (CXCL10), провоспалительный хемокин [Mamishi S. et al., 2019], эндогенно ингибирующий образование ГСК из плюрипотентных стволовых клеток [Bodnar R. J. et al., 2006], через взаимодействие с CXCR3 рецепторами [Rahman N. et al., 2017]. У мышей с дефицитом IP-10 выявлено нарушение воспалительных сигналов, в том числе, опосредованные IFN γ и TNF- α [Groom J.R., Luster A.D., 2011]. Установлена зависимость продукции IP-10 и его пролиферативных/антипролиферативных эффектов от притока ионов кальция в клетку [Liu M. et al., 2011].

Учитывая вышесказанное, следует особо подчеркнуть значение выявленных нами отрицательных корреляций между содержанием [CD45,34,14,20]⁺ клеток с уровнем провоспалительных медиаторов в среде культивирования ММСК, в частности с TNF α ($r=0,83$, $p<0,05$) и IP-10 ($r=-0,68$, $p<0,05$). Т.е., снижение продукции молекул с провоспалительным действием может потенцировать рост числа ГСК в экспериментальной 3D модели дистантного культивирования ММСК.

В свою очередь, IL-6 является известным плеiotропным провоспалительным цитокином, который играет ключевую роль в контроле иммунитета и воспаления [Tie R. et al., 2019; Rose-John S., 2020], а также участвует в регуляции гемопоэза, метаболизме костной ткани, эмбриональном развитии и других фундаментальных

процессах [Tie R. et al., 2019]. Показано, что IL-6 стимулирует иммуномодулирующие функции ММСК, повышая паракринную передачу сигналов и приводит к пролиферации клеток [Sovkova V. et al., 2021]. Несмотря на более низкое содержание этого медиатора в экспериментальной модели сокультивирования ММСК (на 20% ниже относительно данных 2D модели) (таблица 3), обнаруженная нами прямая корреляция ($r=0,71$, $p<0,05$) между его содержанием и числом клеток с фенотипом $[CD45,34,14,20]^+$, может свидетельствовать о том, что его убывание в среде культивирования ММСК способствует стимуляции роста гемопоэтических клеток.

Известно, что запуск апоптоза клеток интерферонами может быть активирован напрямую, либо посредством индукции каспазы-1, FAS и TRAIL [Masouridi-Levrat S., Simonetta F., Chalandon Y., 2016]. Последний является членом суперсемейства TNF и взаимодействует с рецепторами суперсемейства TNF [Rochette L. et al., 2019]. В проведенном нами исследовании, содержание TRAIL в экспериментальных 3D-культурах ММСК было в 1,5 раза ниже относительно значений 2D-культур ММСК ($p<0,05$) (таблица 3).

Существенная роль системы TRAIL / TRAIL-R заключается в регуляции и модуляции апоптоза, посредством активации каскада каспаз, инициирующих клеточную гибель в результате апоптоза [Rochette L. et al., 2019]. Rochette L. et al. (2019) отмечают функциональную дуальность TRAIL, который, с одной стороны, потенцирует индукцию апоптоза и стимулирует воспаление, но также, вероятно, может способствовать выживанию клеток и подавлять воспалительную реакцию. Предполагают, что его противоположные эффекты зависят от концентрации [Rochette L. et al., 2019]. TRAIL-индуцированный апоптоз не ингибируется IL-6, который блокирует различные проапоптотические сигналы, включая лигирование Fas [Tinhofer I. et al., 2006].

В то же время, выявленное нами в среде 3D модели культивирования ММСК более высокое (в 2,8 раз по сравнению с 2D моделью культивирования на пластике) содержание хемокина RANTES, может быть обусловлено увеличением числа клеток с фенотипом $[CD45,34,14,20]^+$, что подтверждается позитивной корреляцией между этими параметрами ($r=7,64$, $p<0,05$). Установлено, что хемокин RANTES

вовлечен в регуляцию развития и функциональной активности различных гемопоэтических клеток-предшественниц, в том числе, моноцитарного ряда. Его синтез осуществляется, главным образом, различными иммунокомпетентными клетками [Mikolajczyk T.P. et al., 2016]. Однако в ряде экспериментальных работ было показано, что источником RANTES могут быть также остеобласты и остеокластоподобные клетки в ответ на рост внеклеточного Ca^{2+} в костном микроокружении во время резорбции кости [Yano S. et al., 2005].

В связи с вышесказанным, обнаруженная нами взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *ALPL* и содержанием хемокина RANTES ($r=0,72$, $p<0,05$) в 3D-модели культивирования ММСК может также свидетельствовать о синтезе этого хемокина остеобластами в культуре ММСК. Как уже упоминалось выше, ионы Ca^{2+} , выделяющиеся при деградации биоматериала [Tian T. et al., 2019], запускают дифференцировку ММСК в остеобласты через экспрессию кальций-связывающих протеинов и являются индуктором экспрессии ЩФ и митогеном для остеобластов [Carlier A. et al., 2011].

Кроме того, отрицательная корреляция содержания RANTES с числом мертвых клеток ($r=-0,82$, $p<0,05$), обнаруженная нами в 3D экспериментальных культурах ММСК, может свидетельствовать о протекторном действии этого хемокина в отношении ММСК. Выявленный факт подтверждён данными литературы, свидетельствующими, что RANTES, помимо его классических функций в отношении иммунокомпетентных клеток, является хемоаттрактантом для остеобластов и молекулой, способствующей их выживанию [Yano S. et al., 2005].

Таким образом, проанализировав изменение продукции ключевых факторов с провоспалительной активностью культурой ММСК, следует отметить, что с одной стороны, воспаление - это защитная реакция на повреждение ткани, оптимальная сила и продолжительность которого необходимы для подготовки ткани к последующей регенерации [Schmidt-Bleek K. et al., 2015]. С другой стороны, клетки с провоспалительным функционалом и их медиаторы не всегда необходимы для регенерации тканей; их отсутствие может ускорить заживление ран [Kolar P. et al., 2010]. Этот факт можно интерпретировать тем, что ММСК и их

производные (остеобласты, хондробласты и фибробласты) могут секретировать как воспалительные, так и остеогенные цитокины в течение 7–14 дней после травмы и на последующих этапах регенерации/заживления [Kon T. et al., 2001], что было убедительно доказано в нашем экспериментальном исследовании, при дистантном воздействии КФ покрытий на ММСК. При этом успешная санация очага повреждения и продукция репаративных цитокинов для устранения воспалительной среды и восстановления гомеостаза тканей способствуют (нео)ангиогенезу [Loi F. et al., 2016].

Далее, наряду с продукцией провоспалительных факторов, в экспериментальных 3D-культурах ММСК нами были проанализированы концентрации некоторых медиаторов, оказывающих влияние на жизнедеятельность ГСК. Согласно полученным результатам, содержание медиаторов LIF, SCF и G-CSF в супернатантах экспериментальных трехмерных культур ММСК значительно превышало (в 1,4; 2,75 и 4,2 раза) соответствующие контрольные значения 2D культур ММСК на пластике на 14 сутки культивирования (**таблица 4**).

SCF и G-CSF, являясь одними из ключевых членов семейства гемопоэтических факторов роста, регулируют кроветворение, способствуя увеличению клеток-предшественниц периферической крови [Mickiene G. et al., 2020]. В частности, SCF – важный компонент васкулярной ниши для самоподдержания популяции ГСК; экспрессируется *in vitro* фибробластоподобными клетками костного мозга, эндотелиальными клетками, CXCL12⁺ стромальными клетками, нестин⁺ ММСК [He N. et al., 2014]. Предполагают, что в естественных условиях выступает как специфичная молекула эндотелиальных клеток для регуляции гомеостаза ГСК [Nakamura-Ishizu A., Suda T., 2013]. Установлено, что SCF, экспрессируемый остеобластами, важен для мобилизации ГСК [Li S.D. et al., 2017].

G-CSF – один из основных гемопоэтических факторов, стимулирует пролиферацию поздних клеток-предшественниц, а также регулирует функции зрелых гранулоцитов, способствуя увеличению продолжительности их жизни [Layton J.E., Hall N.E., 2006]. G-CSF продуцируется стромальными клетками костного мозга, фибробластами, эндотелиальными клетками, астроцитами [Hoggatt

J. et al., 2016], моноцитами, макрофагами и лимфоцитами [Zhao M., Li L., 2015]. Продукция G-CSF, в целом, является индуцибельной, то есть зависимой от клеточного микроокружения [Lucas D., 2017]. Экспериментальные работы Li S.-D. et al. (2017) показали значительное снижение функциональной активности и количества остеобластов при воздействии G-CSF [Li S.D., et al., 2017].

В свою очередь LIF, в основном, продуцируется регуляторными T-клетками [Nicola N.A., Babon J.J., 2015], стромальными клетками костного мозга [Lorgeot V. et al., 1997]. Установлено, что этот медиатор способствует самоподдержанию популяции и тотипотентности эмбриональных стволовых клеток (ЭСК); плюрипотентности гемопоэтических стволовых клеток мыши [Nicola N.A., Babon J.J., 2015], ограничивая их дифференцировку [Smith A.G. et al., 1988]; обеспечивает стимуляцию пролиферации миелоидных клеток [Moreau J.F. et al., 1987] и мегакариопоэза [Nicola N.A., Babon J.J., 2015], а также стимулирует дифференцировку ММСК в остеобласты (но не в адипоциты) [Walker E.C. et al., 2010]; потенцирует разрушение хряща [Sims N.A., Johnson R.W., 2012]. Кроме того, LIF поддерживает равновесный баланс между дифференцировкой ММСК в остеобласты и обеспечением ММСК-зависимого гемопоэза [Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I., 1996]. Интересным является тот факт, что остеокласты не экспрессируют LIF-R и не продуцируют LIF, что позволяет предположить, что эффекты LIF на эти клетки косвенно опосредуются через остеобласты и остециты, посредством экспрессии RANKL [Palmqvist P. et al., 2002; Nicola N.A., Babon J.J., 2015].

Таким образом, LIF, SCF и G-CSF могут быть гемопоэтинами для наращивания ГСК, лимфоидных и гранулоцитарных прекурсоров (на фоне снижения продукции факторов с провоспалительным и проапоптотическим действием) в остеобластных микротерриториях, формирующихся *in vitro* из ММСК на КФ поверхности и трехмерных очагов (узелков) минерализации на пластике вокруг образцов. Вышесказанное также подтверждается выявленными нами прямыми корреляциями числа [CD45,34,14,20]⁺ клеток в экспериментальных 3D культурах ММСК с медиаторами - LIF, SCF и G-CSF ($r=0,81$, $r=0,75$, $r=0,68$; $p<0,05$ во всех случаях, соответственно).

Логично предположить, что невысокие уровни их секреции в проведённом нами эксперименте обусловлены большим объемом культуральной среды (1,5 мл) для супернатантов. В то же время, в пределах кроветворных микротерриторий с площадью в несколько сотен квадратных микрометров [Khlusov I.A. et al., 2018], локальные концентрации данных факторов роста могут достигать огромных значений.

Резюмируя вышесказанное, при экспериментальном дистантном сокультивировании ММСК с 3D матриксами с КФ покрытием, на 14-е сутки регистрируется завершение провоспалительной фазы, что характеризуется снижением содержания провоспалительных (TNF α , IFN γ , IP-10, IL-6) и проапоптотических (TRAIL) медиаторов в культуре клеток, а также началом дифференцировки ММСК в остеобласты (повышение экспрессии гена *ALPL*). Мы предполагаем, что секреция ММСК провоспалительных биомолекул *in vitro*, по принципу обратной связи, тормозит экспрессию их генов, что может быть ключевым моментом переключения на экспрессию ММСК остеогенных генов (в частности, *ALPL*). Кроме того, в условиях увеличения продукции ММСК и остеобластами факторов с остеомодулирующими свойствами, а также функцией сигнальных молекул кроветворных ниш (LIF, SCF и G-CSF), протекает закладка микротерриторий гемопоэтических стволовых клеток.

Далее, нами была предпринята попытка оценить дистантное влияние образцов с КФ покрытием на формирование участков/узелков минерализации межклеточного матрикса в культурах ММСК и изменение числа клеток с морфологией кроветворных (площадь минерализации межклеточного матрикса и подсчёт числа кроветворных клеток оценивали на пластике, около экспериментальных образцов), в условиях 21-суточного культивирования.

Так, при дистантном сокультивировании ММСК с образцами, несущими КФ покрытие, значительно увеличивалась суммарная площадь участков/узелков минерализации межклеточного матрикса на пластике вокруг образцов (в сравнении с контрольной 2D культурой клеток без образцов) (**рисунок 10, таблица 6**).

Следует отметить, что площадь участков минерализации межклеточного матрикса в полях зрения в культурах ММСК в присутствии образцов с КФ

покрытием была выше, чем в 2D культурах ММСК без образцов, но менее значительной в сравнении с культивированием ММСК в остеогенной дифференцировочной среде (2D модель_остео) (2,74 (1,75 – 4,77) см² против 3,95 (1,86 – 6,61) см²) (**рисунок 10, таблица 6**).

Однако при проведении морфометрического исследования культур ММСК на 21 сутки, в остеогенной дифференцировочной среде (2D модель_остео), количество клеток с морфологией кроветворных соответствовало контрольным значениям, тогда как анализ культуры ММСК в присутствии 3D матриц (Ra=2,0-3,0 мкм), позволил выявить достоверное увеличение количества *клеток с морфологией кроветворных* около экспериментальных образцов и вокруг участков минерализации, по сравнению с контрольными значениями 2D культуры и культурами ММСК в остеогенной дифференцировочной среде (в среднем, в 3 раза) (**таблица 7, рисунок 11**). Как уже упоминалось ранее, роль остеобластов в регуляции ниши ГСК не вызывает сомнений [de Kruijf E.-J.F.M. et al., 2018]. В частности, экспансия остеобластов связана с увеличением количества ГСК и, наоборот, условное удаление остеобластов связано с потерей ГСК в костном мозге и возникновением очагов экстрамедуллярного гемопоэза [Anthony V.A., Link D.C., 2014].

Важно отметить, что увеличение суммарной площади трёхмерных островков/узелков минерализации на пластике в экспериментальной 3D культуре ММСК коррелировало с ростом содержания клеток с морфологией кроветворных ($r=0,89$, $p<0,05$), а также было положительно взаимосвязано с концентрацией остеокальцина в среде культивирования ($r=0,87$; $p<0,05$). Следует отметить также наличие положительной взаимосвязи между концентрацией остеокальцина и числом кроветворных клеток ($r=0,90$, $p<0,05$).

Взаимосвязь между суммарной площадью островков/узелков минерализации на пластике и числом клеток с морфологией гемопоэтических в *in vitro* моделях ММСК также была убедительно продемонстрирована с помощью регрессионного анализа ($r=0,5871$, $p<0,05$) (**рисунок 12**).

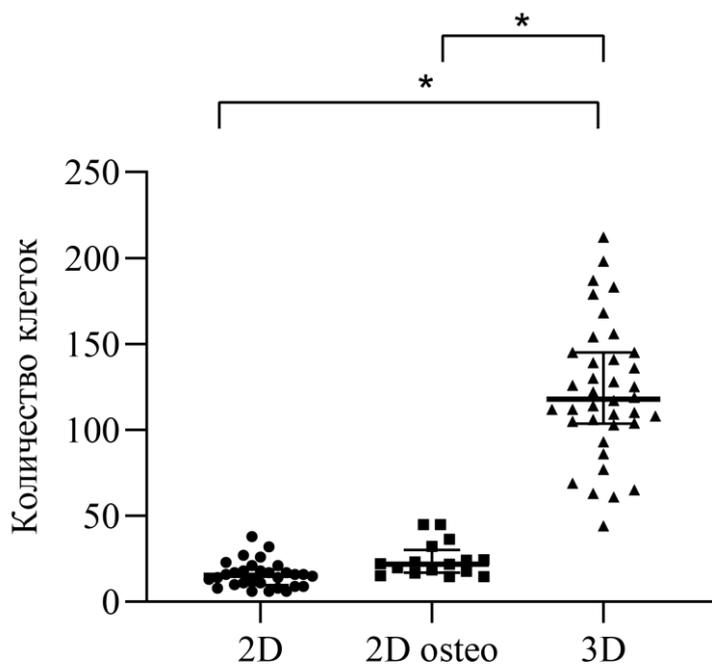


Рисунок 11. Число кроветворных клеток в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования – 21 день), Ме (Q₁ - Q₃)

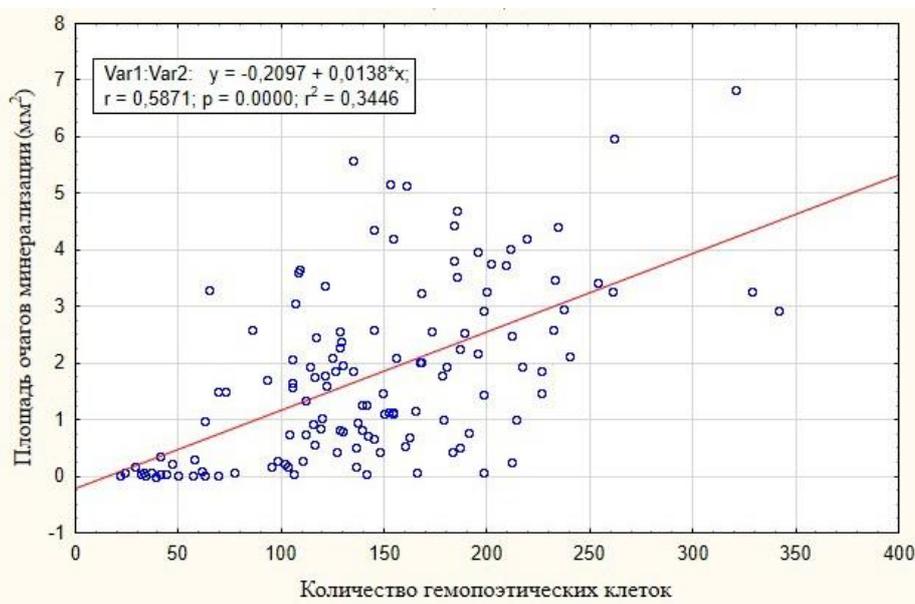


Рисунок 12. Регрессионная зависимость числа гемопоэтических клеток от суммарной площади трехмерных очагов/узелков минерализации (мм²) на пластике в *in vitro* моделях ММСК

Выявленное увеличение уровня остеокальцина, регистрируемое нами на 21 сутки культивирования, в супернатантах экспериментальных 3D культур ММСК относительно значений контроля, может свидетельствовать об инициации процессов формирования внеклеточного костного матрикса [Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Следует отметить, что неколлагеновые белки составляют около 10% от общего объема костного внеклеточного матрикса; тем не менее, они являются биологически активными и модулируют различные процессы в костной ткани, такие как адгезия и дифференцировка клеток, процессы минерализации и резорбции / ремоделирование кости. Остеокальцин представляет собой специфический неколлагеновый белок костной ткани, секретируемый на поздней стадии дифференцировки остеобластов, который после карбоксилирования высвобождается во внеклеточное пространство и интегрируется в костный матрикс, где связывается с гидроксиапатитом [Carvalho M.S. et al., 2020; Gerosa L., Lombardi G., 2021].

В целом, остеокальцин является важным регулятором минерализации и ангиогенеза - двух важных механизмов восстановления кости. Дефицит остеокальцина нарушает пролиферацию, остеогенную дифференцировку, минерализацию и ангиогенный потенциал ММСК [Carvalho M.S. et al., 2020].

Подводя итог вышесказанному, КФ покрытие, посредством продуктов биodeградации, активирует *in vitro* дифференцировку части пула ММСК в остеобласты, что сопровождается снижением числа клеток, экспрессирующих маркёры ММСК [CD73, CD90, CD105]⁺, ростом экспрессии гена *ALPL*, снижением продукции ММСК сигнальных молекул с провоспалительной и проапоптотической активностью и, напротив, увеличением содержания в среде культивирования сигнальных молекул кроветворных ниш (LIF, SCF и G-CSF) (все изменения регистрировались нами на 14 сутки культивирования); увеличением суммарной площади трехмерных очагов/узелков минерализации межклеточного матрикса на пластике в полях зрения в культуре ММСК (на 21 сутки культивирования). Как следствие, появление так называемых “остеобластных ниш” в культуре ММСК способствует накоплению ГСК (в малом количестве присутствующих в первичной

культуре ММСК), регистрируемого нами в виде повышения содержания клеток с фенотипом [CD45,34,14,20]⁺ на 14 сутки культивирования и роста числа клеток с морфологией кроветворных на 21 сутки эксперимента, через контроль гуморальных и клеточных механизмов их жизнедеятельности (**рисунок 13**).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальное *in vitro* 3D моделирование функционирования мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) в условиях системы "регенерирующая кость/кроветворное микроокружение", предпринятое нами, позволило получить новые фундаментальные знания в области физиологии ремоделирования костной ткани.

Используемая нами 3D модель дистантного сокультивирования ММСК-ЖТ с трёхмерными матриксами с КФ покрытием, имитирующая прообраз системы кость/надкостница/костный мозг, модулирует условия функционирования ММСК, приближенные к реальным, позволяя детектировать процессы формирования костной ткани. Согласно полученным нами результатам, морфофункциональные реакции ММСК-ЖТ на трехмерной границе раздела кровь/кость значительно отличаются от существующих представлений о физиологических механизмах функционирования ММСК в условиях 2D сокультивирования *in vitro* на пластике.

Наше исследование убедительно продемонстрировало, что ММСК-ЖТ являются ключевыми регуляторами нишевых территорий, обеспечивающих формирование костной ткани. Так, согласно полученным нами результатам, остеогенная дифференцировка ММСК-ЖТ в присутствии 3D образцов с КФ покрытием, опосредованная продуктами биodeградации матрикса, способствует формированию *in vitro* «остеобластных ниш» и «ниш кроветворных клеток», посредством создания эффективной гуморально-клеточной кооперации ММСК, остеобластов и гемопоэтических клеток (**рисунок 13**).

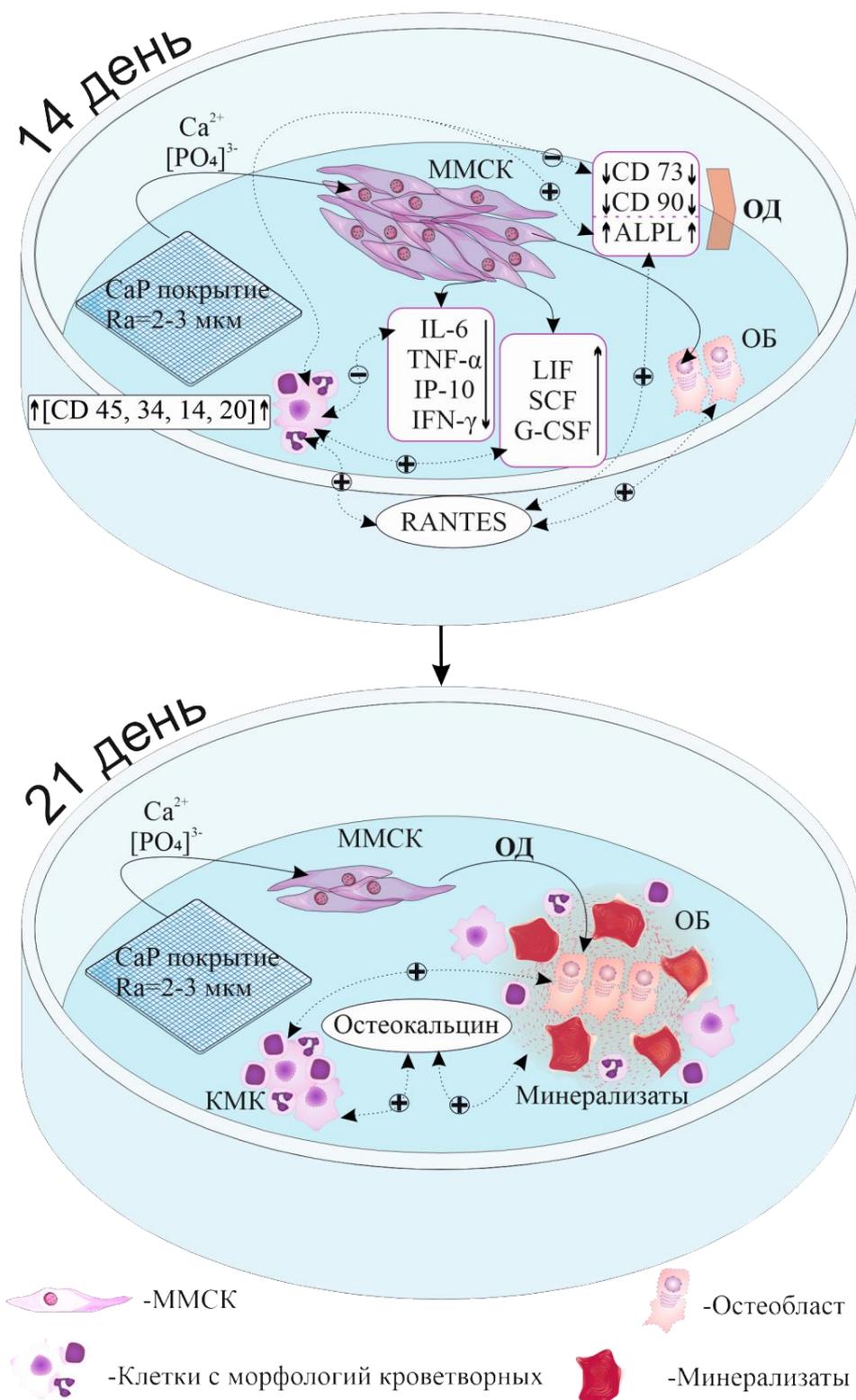


Рисунок 13. Схема, отражающая клеточные и гуморальные регуляторные механизмы остеогенеза и гемопоэза, в условиях *дистантного* *in vitro* культивирования мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека с трёхмерным скаффолдом с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральный матрикс костной ткани

Проведённое нами исследование, в дальнейшем, может способствовать выявлению различных вариантов/паттернов клеточных реакций ММСК в физиологической трехмерной среде, которая (в зависимости от комбинации сигналов окружающей среды) физически и химически влияет на гомеостаз клеток. Полученные нами результаты, безусловно, нуждаются в дальнейшем изучении. В целом, детальное исследование закономерностей и механизмов функционирования ММСК в условиях *in vitro* моделирования системы "регенерирующая кость/крововетворное микроокружение, может стать перспективной стратегией для обеспечения жизнедеятельности и направленного масштабирования клеточных популяций из пула стволовых клеток в *in vitro* условиях, приближенных к физиологическим.

ВЫВОДЫ

1. Мультипотентные мезенхимальные стромальные/стволовые клетки жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека дифференцируются в остеобласты, секретирующие остеокальцин и минерализованный костный матрикс, что сопровождается снижением экспрессии [CD73, CD90]⁺ маркеров стволовости, ростом экспрессии мРНК гена щелочной фосфатазы (*ALPL*), увеличением в культуре доли [CD45,34,14,20]⁺ и морфологически идентифицируемых гемопоэтических клеток в условиях экспериментального моделирования процессов регенерации системы "кость/костный мозг" при 14-21-суточном дистантном *in vitro* культивировании с трёхмерным скаффолдом, несущим кальцийфосфатное покрытие, имитирующее минеральный матрикс костной ткани.
2. Увеличение числа [CD45,34,14,20]⁺ кроветворных клеток в 14-дневной культуре ММСК-ЖТ, дистантно контактирующих с трёхмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием, прямо коррелирует с содержанием в среде культивирования хемокина RANTES и уровнем экспрессии мРНК гена щелочной фосфатазы (*ALPL*), протекает на фоне снижения концентрации факторов с провоспалительным (IL-6, IP-10, IFN γ и TNF α) и проапоптотическим (TRAIL) действием.
3. Важным фактором, способствующим росту числа гемопоэтических [CD45,34,14,20]⁺ клеток в трехмерной культуре ММСК-ЖТ является нарастание в супернатантах концентрации молекул LIF, SCF и G-CSF.
4. Суммарное увеличение площади островков минерализации культуры ММСК-ЖТ в условиях 21-дневного присутствия скаффолда с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральное вещество костной ткани, прямо коррелирует с ростом концентрации остеокальцина в среде культивирования и увеличением содержания морфологически идентифицируемых гемопоэтических клеток.
5. Моделирование структурно-функционального состояния костномозговых лакун костной ткани определяет способность культуры ММСК-ЖТ человека формировать *in vitro* прообраз системы "кость/костный мозг", посредством активной гуморальной и межклеточной кооперации в развитии минерализованного костного матрикса, как тканевого элемента гемопоэиндуцирующего микроокружения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г. Г. Диагностическая медицинская плоидометрия: учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / Г. Г. Автандилов. – Москва: Медицина, 2006. – 191 с.
2. Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия. Руководство / Г.Г. Автандилов. - Москва: Медицина, 1990. – 384 с.
3. Концепция “ниша-рельеф” для стволовых клеток как основа биомиметического подхода к инженерии костной и кроветворной тканей / И. А. Хлусов, Н. М. Шевцова, М. Ю. Хлусова и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Vol. VI, № 2. – P. 55–64.
4. Новицкий, В. В. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / В. В. Новицкий, В. П. Шахов, И. А. Хлусов. – Томск: СТТ, 2004. – 386 с.
5. Риггз, Б. Л. Остеопороз / Б. Л. Риггз, Ш Л. Дж. Мелтон. – Санкт-Петербург: ЗАО «Издательство БИНОМ», «Невский диалект», 2000. – 560 с.
6. A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials / W. Harun, R. I. M. Asria, J. Alias et al. // *Ceram. Int.* – 2018. – Vol. 2, № 44. P. 1250–1268.
7. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells / D. A. Moraes, T. T. Sibov, L. F. Pavon et al. // *Stem Cell Res. Ther.* – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 97.
8. A role of TRAIL in killing osteoblasts by myeloma cells / I. Tinhofer, R. Biedermann, M. Krismer et al. // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, № 6. – P. 759–761.
9. Activated Gs signaling in osteoblastic cells alters the hematopoietic stem cell niche in mice / K. Schepers, E. C. Hsiao., T. Garg et al. // *Blood.* – 2012. – Vol. 120. – P. 3425–3435.
10. Adaptation of human CD4+ T cells to pathophysiological hypoxia: a transcriptome analysis / T. Gaber, T. Haupl, G. Sandig et al. // *J. Rheumatol.* – 2009. – Vol. 36. – P. 2655–2669.

11. Adenosine production by biomaterial-supported mesenchymal stromal cells reduces the innate inflammatory response in myocardial ischemia/reperfusion injury / E. Y. Shin, L. Wang, M. Zemskova et al. // *Journal of the American Heart Association*. – 2018. – Vol. 7, № 2. – P. 006949.
12. Adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells display different osteogenic differentiation patterns in 3D bioactive glass-based scaffolds / S. N. Rath, P. Nooeaid, A. Arkudas et al. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2016. – Vol. 10. – P. E497–E509.
13. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: State of the art / M. Barba, C. Cicione, C. Bernardini et al. // *BioMed. Res. Int.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 416391.
14. Adult stem cell coatings for regenerative medicine / D. W. Green, G. Li, B. Milthorpe et al. // *Materials Today*. – 2012. – Vol. 15, № 1-2. – P. 60–66.
15. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials / K. Anselme // *Biomaterials*. – 2000. – Vol. 7, № 21. – P. 667–681.
16. Anthony, B. A. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells Trends / B. A. Anthony, D. C. Link // *Immunol.* – 2014. – Vol. 35, № 1. – P. 32–37.
17. Antimicrobial and Osseointegration Properties of Nanostructured Titanium Orthopaedic Implants / M. Jäger, H. P. Jennissen, F. Dittrich et al. // *Materials (Basel)*. – 2017. – Vol. 10, № 11. – P. 1302.
18. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections / M. Kazemzadeh-Narbat, J. Kindrachuk, K. Duan et al. // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 36, № 31. – P. 9519–9526.
19. Anton, K. Macrophage-associated mesenchymal stem cells assume an activated, migratory, pro-inflammatory phenotype with increased IL-6 and CXCL10 secretion / K. Anton, D. Banerjee, J. Glod // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – P. 35036.
20. Arai, F. Quiescent stem cells in the niche / F. Arai, T. Suda. – Cambridge: Harvard Stem Cell Institute; 2008. – 11 p.

21. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery / E. Chiarello, M. Cadossi, G. Tedesco et al. // *Aging Clin. Exp. Res.* – 2013. – Vol. 1. – P. 101–103.
22. Baldrige, M. T. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells / M. T. Baldrige, K. Y. King, M. A. Goodell // *Trends Immunol.* 2011. – Vol. 32, № 2. – P. 57–65.
23. Baron, R. *Diseases of Bone and Mineral Metabolism* / R. Baron. - United States of America: Endotext, 2008.
24. Behavioral Changes of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Contact with Synthetic Calcium Phosphates in vitro / L.S. Litvinova, V.V. Shupletsova, O.G. Khaziakhmatova et al. // *Cell and Tissue Biology.* – 2018. Vol. 12, № 2. – P. 112–119.
25. Bellido, T. Osteocyte-driven bone remodeling / T. Bellido // *Calcif. Tissue Int.* – 2014. – Vol. 94. – P. 25–34.
26. Bernardo, M. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation / M. E. Bernardo, W. E. Fibbe // *Cell Stem Cell.* – 2013. – Vol. 13. – P. 392–402.
27. Bhatt, R.A. Bone graft substitutes / R. A. Bhatt, T. D. Rozental // *Hand Clin.* – 2012. – Vol. 28, № 4. – P. 457–468.
28. Bielby, R., Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone / R. Bielby, E. Jones, D. McGonagle // *Injury.* – 2007. – Vol. 38, № 1. – P. 26–32.
29. Bioactive titanium calcium phosphate coating for disc arthroplasty: analysis of 58 vertebral end plates after 6- to 12-month implantation / B. W. Cunningham, N. Hu, C. M. Zorn et al. // *Spine J.* – 2009. – Vol. 10, № 9. – P. 836–845.
30. *Bioceramics and biocomposites: from research to clinical practice* / edited by Iulian Antoniac. *Bioactive Micro-arc Calcium Phosphate Coatings on Nanostructured and Ultrafine-Grained Bioinert Metals and Alloys* / Yu. Sharkeev, E. Komarova, M. Sedelnikova et al. – United States of America: Wiley Online Library, 2019. – 400 p.

31. Biofunctionalization of metallic implants by calcium phosphate coatings / Y. Su, I. Cockerill, Y. Zheng et al. // *Bioact. Mater.* – 2019. – Vol. 4. – P. 196–206.
32. Biophysical Regulation of Cell Behavior-Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography / Y. Yang, K. Wang, X. Gu et al. // *Engineering (Beijing)*. – 2017. – Vol. 3, № 1. – P. 36– 54.
33. Birgersdotter, A. Gene expression perturbation in vitro – a growing case for three-dimensional (3D) culture systems / A. Birgersdotter, R. Sandberg, I. Ernberg // *Semin. Cancer Biol.* – 2005. – Vol. 15. – P. 405–412.
34. Bodnar, R. J. IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain / R. J. Bodnar, C. C. Yates, A. Wells // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 98. – P. 617–625.
35. Boggs, S. S. The hematopoietic microenvironment: Phylogeny and ontogeny of the hematopoietic microenvironment / S. S. Boggs // *Hematology*. – 1999. – Vol. 4, № 1. – P. 31–44.
36. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche / A. Chow, D. Lucas, A. Hidalgo et al. // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208, № 2. – P. 261–271.
37. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs / I. G. Winkler, N. A. Sims, A. R. Pettit et al. // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, № 23. – P. 4815–4828.
38. Bone Marrow Vascular Niche: Home for Hematopoietic Stem Cells / N. He, L. Zhang, J. Cui et al. // *Bone Marrow Research*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 128436.
39. Bonfini, A. Reversible regulation of stem cell niche size associated with dietary control of Notch signaling / A. Bonfini, M. B. Wilkin, M. Baron // *BMC Dev. Biol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 8.
40. Boon and bane of inflammation in bone tissue regeneration and its link with angiogenesis / K. Schmidt-Bleek, B. J. Kwee, D. J. Mooney et al. // *Tissue Eng. Part B Rev.* – 2015. – Vol. 21, № 4. – P. 354–364.
41. Boyle, W. J. Osteoclast differentiation and activation / W. J. Boyle, W. S. Simonet, D. L. Lacey // *Nature*. – 2003. – Vol. 423. – P. 337–42.

42. Brydone, A. S. Bone grafting, orthopedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering / A. S. Brydone, D. Meek, S. Maclaine // *Proc. Inst. Mech. Eng. H.* – 2010. – Vol. 224, № 12. – P. 1329–1343.
43. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys / R. Narayanan, S. K. Seshadri, T. Y. Kwon et al. // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2008. – Vol. 1, № 85B. – P. 279–299.
44. Calvi, L. M. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease / L. M. Calvi, D. C. Link // *Blood.* – 2015. – Vol. 126, № 22. – P. 2443–2451.
45. CCR5 Signaling Promotes Murine and Human Hematopoietic Regeneration following Ionizing Radiation / S. O. Piryani, A. Y. F. Kam, U. T. Vu et al. // *Stem Cell Reports.* – 2019. – Vol. 13, № 1. – P. 76–90.
46. CD105 (Endoglin) as negative prognostic factor in AML / J. Kauer, K. Schwartz, C. Tandler et al. // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 18337.
47. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells / A. Ode, J. Schoon, A. Kurtz et al. // *Eur. Cell Mater.* – 2013. – Vol. 25. – P. 37–47.
48. CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation / M. Takedachi, H. Oohara, B. J. Smith et al. // *J. Cell Physiol.* – 2012. – Vol. 227. – P. 2622–2631.
49. Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: a study in sheep / K. Schmidt-Bleek, H. Schell, P. Kolar et al. // *J. Orthop. Res.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1147–1151.
50. Cellular Response to Individual Components of the Platelet Concentrate / V. Sovkova, K. Vocetkova, V. Hedvičáková et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 9. – P. 4539.
51. Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro / Y. Gu, T. Li, Y. Ding et al. // *Mol. Med. Rep.* – 2016. – Vol. 13. – P. 5207–5215.
52. Chapman, J. *Histology, Hematopoiesis* / J. Chapman, Y. Zhang. – United States of America: Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2021.
53. Characterization of a factor produced by human T cell clones exhibiting eosinophil-activating and burst-promoting activities / J. F. Moreau, M. Bonneville, A. Godard et al. // *Journal of Immunology.* – 1987. – Vol. 138. – P. 3844–3849.

54. Chavez, J. S. Hematopoietic Stem Cells Rock Around The Clock: Circadian Fate Control via TNF/ROS Signals / J. S. Chavez, E. M. Pietras // *Cell Stem Cell*. – 2018. – Vol. 23, № 4. – P. 459–460.
55. Chung, C. Systematic strontium substitution in hydroxyapatite coatings on titanium via micro-arc treatment and their osteoblast/osteoclast responses / C. Chung, H. Long // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 11, № 7. – P. 4081–4087.
56. Claes, L. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions / L. Claes, S. Recknagel, A. Ignatius // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2012. – Vol. 8. – P. 133–143.
57. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges / C. S. Lin, Z. C. Xin, J. Dai et al. // *Histol. Histopathol.* – 2013. – Vol. 28, № 9. – P. 1109–1116.
58. Comparative study on in vitro biocompatibility of synthetic octacalcium phosphate and calcium phosphate ceramics used clinically / S. Morimoto, T., Anada, Y. Honda et al. // *Biomed Mater.* – 2012. – Vol. 4, № 7. – P. 45020.
59. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue / J. S. Heo, Y. Choi, H. S. Kim et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2016. – Vol. 37. – P. 115–125.
60. Comparison of osteogenic differentiation potential of human adult stem cells loaded on bioceramic-coated electrospun poly (L-lactide) nanofibres / A. Ardeshirylajimi, M. Mossahebi-Mohammadi, S. Vakilian et al. // *Cell Prolif.* – 2015. – Vol. 48. P. 47–58.
61. Concept of Hematopoietic and Stromal Niches for Cell-Based Diagnostics and Regenerative Medicine (a Review) / I. A. Khlusov, L. S. Litvinova, M. Yu. Khlusova et al. // *Current Pharmaceutical Design.* – 2018. – Vol. 24, № 26. – P. 3034–3054.
62. Conversion of danger signals into cytokine signals by hematopoietic stem and progenitor cells for regulation of stress-induced hematopoiesis / J. L. Zhao, C. Ma, R. M. O'Connell et al. // *Cell Stem Cell*. – 2014. – Vol. 14. – P. 445–459.
63. Cotransplantation of cord blood hematopoietic stem cells and culture-expanded and GM-CSF-/SCF-transfected mesenchymal stem cells in SCID mice / J. Y. Han,

- R. Y. Goh, S. Y. Seo et al. // *J. Korean Med. Sci.* – 2007. – Vol. 22, № 2. – P. 242–247.
64. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications / M. Liu, S. Guo, J. M. Hibbert et al. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2011. – Vol. 22, № 3. – P. 121–130.
65. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array / C. W. Park, K. S. Kim, S. Bae et al. // *Int. J. Stem Cells.* – 2009. – Vol. 2, № 1. – P. 59–68.
66. Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Profile Characterization of Undifferentiated and Osteoinduced Human Adipose-Derived Stem Cells / F. Mussano, T. Genova, M. Corsalini et al. // *Stem Cells Int.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 6202783.
67. Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease / S. Nahar, Y. Nakashima, C. Miyagi-Shiohira et al. // *World J. Stem Cells.* – 2018. – Vol. 10. – P. 146–159.
68. Dellatore, S. M. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion / S. M. Dellatore, A. S. Garsia, W. M. Miller // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 19, № 5. – P. 534–540.
69. Designing optimal calcium phosphate scaffold-cell combinations using an integrative model-based approach / A. Carlier, Y.C. Chai, M. Moesen et al. // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7, № 10. – P. 3573–3585.
70. Dexter, T. M. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro / T. M. Dexter, T. D. Allen, L. G. Lajtha // *J. Cell Physiol.* – 1977. – Vol. 91. – P. 335–344.
71. Diagnostic accuracy of interferon (IFN)- γ inducible protein 10 (IP-10) as a biomarker for the discrimination of active and latent tuberculosis / S. Mamishi, S. Mahmoudi, M. Banar et al. // *Mol. Biol. Rep.* – 2019. – Vol. 46, № 6. – P. 6263–6269.
72. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing / J. Lienau, K. Schmidt-Bleek, A. Peters et al. // *J. Orthop. Res.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1133–1140.

73. Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients / A. B. Faia-Torres, S. Guimond-Lischer, M. Rottmar et al. // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35. – P. 9023–9032.
74. Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces / R. A. Gittens, R. Olivares-Navarrete, T. McLachlan et al. // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – P. 8986–8994.
75. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia / Y. J. Kim, H. K. Kim, H. H. Cho et al. // *Cell. Physiol. Biochem*. – 2007. – Vol. 20. – P. 867–876.
76. Diverse effect of BMP-2 homodimer on mesenchymal progenitors of different origin / E. Hrubí, L. Imre, A. Robaszkiewicz et al. // *Hum. Cell*. – 2018. – Vol. 31, № 2. – P. 139–148.
77. Doblaré, M. Modelling bone tissue fracture and healing: a review / M. Doblaré, J. M. García, M. J. Gómez // *Eng. Fract. Mech*. – 2004. – Vol. 71. – P. 1809–1840.
78. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphate coatings on magnesium and its biodegradable alloys / S. V. Dorozhkin // *Acta Biomater*. – 2014. – Vol. 7, № 10. – P. 2919–2934.
79. Dufrane, D. Impact of age on human adipose stem cells for bone tissue engineering / D. Dufrane // *Cell Transplant*. – 2017. – Vol. 26. – P. 1496–1504.
80. Early hematopoietic and vascular development in the chick / H. Nagai, M. Shin, W. Weng et al. // *Int. J. Dev. Biol*. – 2018. – Vol. 62, № 1–2–3. – P. 137–144.
81. Effect of parameters of microplasma modes and electrolyte composition on characteristics of calcium phosphate coatings on pure titanium for medical use / O. P. Terleeva, Yu. P. Sharkeev, A. I. Slonova et al. // *Surf. Coat. Technol*. – 2010. – Vol. 205. – P. 1723–1729.
82. Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells / I. Song, B. S. Kim, C. S. Kim et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2011. – Vol. 408. – P. 126–131.

83. Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. A scanning electron microscopic study / G. Voggenreiter, R. Ascherl, G. Blümel et al. // Arch. Orthop. Trauma Surg. – 1994. – Vol. 113, № 5. – P. 294–296.
84. Einhorn, T. A. Fracture healing: mechanisms and interventions / T. A. Einhorn, L. C. Gerstenfeld // Nat. Rev. Rheumatol. – 2015. – Vol. 11. – P. 45–54.
85. Endoglin is Highly Expressed in Human Mast Cells / S. T. Brum, A. P. Demasi, R. F. Stelini, M. L. Cintra, V. C. de Araujo, A. B. Soares // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. – 2019. – Vol. 27, № 8. – P. 613–617.
86. Enhancing inflammatory and chemotactic signals to regulate bone regeneration / E. M. Czekanska, J. R. Ralphs, M. Alini et al. // Eur. Cell Mater. – 2014. – Vol. 28. – P. 320–34.
87. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates / A. I. Teixeira, G. A. Abrams, P. J. Bertics et al. // J. Cell Sci. – 2003. – Vol. 15, № 116. – P. 1881–1892.
88. Evaluation of BMP-2 Enhances the Osteoblast Differentiation of Human Amnion Mesenchymal Stem Cells Seeded on Nano-Hydroxyapatite/Collagen/Poly(l-Lactide) / S. Wu, Z. Xiao, J. Song et al. // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19, № 8. – P. 2171.
89. Expression and clinical value of CD105 in renal cell carcinoma based on data mining in The Cancer Genome Atlas / D. Shi, J. Che, Y. Yan et al. // Exp. Ther. Med. – 2019. – Vol. 17, № 6. – P. 4499–4505.
90. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing / T. Kon, T. J. Cho, T. Aizawa et al. // J. Bone Miner. Res. – 2001. – Vol. 16. – P. 1004–1014.
91. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice / M. J. Christopher, M. Rao, F. Liu et al. // The Journal of Experimental Medicine. – 2011. – Vol. 208, № 2. – P. 251 – 260.

92. Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation / T. Assis-Ribas, M. F. Forni, S. M. B. Winnischofer et al. // *Dev. Biol.* – 2018. – P. 437, № 2. – P. 63–74.
93. Fluid shear stress inhibits TNF α -induced osteocyte apoptosis / S. D. Tan, A. M. Kuijpers-Jagtman, C. M. Semeins et al. // *J. Dent. Res.* – 2006. – Vol. 85. – P. 905–909.
94. Formation and properties of bioactive surface layers on titanium / S. V. Gnedenkov, Yu. P. Sharkeev, S. L. Sinebryukhov et al. // *Inorg. Mater: Appl. Res.* – 2011. – Vol. 2, № 5. – P. 474– 81.
95. Forsberg, E. C. Parsing the niche code: the molecular mechanisms governing hematopoietic stem cell adhesion and differentiation / E. C. Forsberg, S. Smith-Berdan // *Haematologica.* – 2009. – Vol. 94, № 11. – P. 1477–1481.
96. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation / L. C. Gerstenfeld, D. M. Cullinane, G. L. Barnes et al. // *J. Cell Biochem.* – 2003. – Vol. 88. – P. 873–884.
97. Frisch, B. J. Hematopoietic niche and bone meet / B. J. Frisch, R. L. Porter, L. M. Calvi // *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* – 2008. – Vol. 2, № 3. – P. 211–217.
98. Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts / S. Yano, R. Mentaverri, D. Kanuparthi et al. // *Endocrinology.* – 2005. – Vol. 146, № 5. – P. 2324–2335.
99. G-CSF Indirectly Induces Apoptosis of Osteoblasts During Hematopoietic Stem Cell Mobilization / S. D. Li, Y. B. Chen, L. G. Qiu et al. // *Clin. Transl. Sci.* – 2017. – Vol. 10, № 4. – P. 287–291.
100. Gentry, S. N. A mathematical model of cancer stem cell driven tumor initiation: implications of niche size and loss of homeostatic regulatory mechanisms / S. N. Gentry, T. L. Jackson // *PLOS one.* – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. 71128.
101. Gerosa, L. Bone-to-Brain: A Round Trip in the Adaptation to Mechanical Stimuli / L. Gerosa, G. Lombardi // *Front Physiol.* – 2021. – Vol. 12. P. 623893.

102. Gibon, E. Aging, inflammation, stem cells, and bone healing // E. Gibon, L. Lu, S. B. Goodman // *Stem Cell Res. Ther.* – 2016. – Vol. 7. – P. 44.
103. Gimble, J.M. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine / J. M. Gimble, A. J. Katz, B. A. Bunnell // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 100. – P. 1249–1260.
104. Grassel, S. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation / S. Grassel, N. Ahmed // *Front. Biosci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 4946–4956.
105. Groom, J. R. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions / J. R. Groom, A. D. Luster // *Immunol. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 89. – P. 207–215.
106. Hall, B. K. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development / B. K. Hall, T. Miyake // *Bioessays.* – 2000. – Vol. 22. – P. 138–147.
107. Hannink, G. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? / G. Hannink, J. J. C. Arts // *Injury.* – 2011. – Vol. 42. – P. 22–25.
108. Harada, S. Control of osteoblast function and regulation of bone mass / S. Harada, G. A. Rodan // *Nature.* – 2003. – Vol. 423. – P. 349–355.
109. Harwood, P. J. An update on fracture healing and non-union / P. J. Harwood, J. B. Newman, A. L. R. Michael // *Orthop. Trauma.* – 2010. – Vol. 24. – P. 9–23.
110. Haynesworth, S. E. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha / S. E. Haynesworth, M. A. Baber, A. I. Caplan // *J. Cell Physiol.* – 1996. – Vol. 766, № 3. – P. 585–592.
111. Hoggatt, J. Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease / J. Hoggatt, Y. Kfoury, D. T. Scadden // *Annu. Rev. Pathol.* – 2016. – Vol. 11. – P. 555–581.

112. Hojo, H. Identification of the gene-regulatory landscape in skeletal development and potential links to skeletal regeneration / H. Hojo, U. I. Chung, S. Ohba // *Regen. Ther.* – 2017. – Vol. 6. – P. 100–107.
113. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia / M. H. Moon, S. Y. Kim, Y. J. Kim et al. // *Cell Physiol. Biochem.* – 2006. – Vol. 17. – P. 279–290.
114. Human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)/stem cell factor (SCF) fusion proteins: design, characterization and activity / G. Mickiene, I. Dalgėdienė, G. Zvirblis et al. // *PeerJ.* – 2020. – Vol. 8. – P. 9788.
115. Human mesenchymal stromal cells inhibit platelet activation and aggregation involving CD73-converted adenosine / P. Netsch, S. Elvers-Hornung, S. Uhlig et al. // *Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 184.
116. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size / J. Zhang, C. Niu, L. Ye et al. // *Nature.* – 2003. – Vol. 425. – P. 836–841.
117. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size / J. Zhang, C. Niu, L. Ye et al. // *Nature.* – 2003. – Vol. 425, № 6960. – P. 836–841.
118. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae / P. Palmqvist, E. Persson, H. H. Conaway et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169, № 6. – P. 3353–62.
119. Imaging the Vascular Bone Marrow Niche During Inflammatory Stress / K. Vandoorne, D. Rohde, H. Y. Kim et al. // *Circ. Res.* – 2018. – Vol. 123, № 4. – P. 415–427.
120. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis / K. Kondo, S. Shintani, R. Shibata et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 61–66.
121. In vitro response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone morphogenic protein-2 in the early and late stages of

- osteoblast differentiation / I. S. Kim, Y. M. Song, T. H. Cho et al. // *Dev. Growth Differ.* – 2008. – Vol. 50, № 7. – P. 553–564.
122. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells / S. H. Cheshier, S. J. Morrison, X. Liao et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96, № 6. – P. 3120–3125.
123. Inferior In Vivo Osteogenesis and Superior Angiogenesis of Human Adipose-Derived Stem Cells Compared with Bone Marrow-Derived Stem Cells Cultured in Xeno-Free Conditions: Ectopic Bone Formation with BM and at Stem Cells / M. A. Brennan, A. Renaud, F. Guilloton et al. // *Stem Cells Transl. Med.* – 2017. – Vol. 6. – P. 2160–2172.
124. Inflammation Differentially Modulates the Biological Features of Adult Derived Human Liver Stem/Progenitor Cells / H. El-Kehdy, M. Najar, J. De Kock et al. // *Cells.* – 2020. – Vol. 9, № 7. – P. 1640.
125. Inflammation, fracture and bone repair / F. Loi, L. A. Córdova, J. Pajarinen et al. // *Bone.* – 2016. – Vol. 86. – P. 119–130.
126. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides / A. G. Smith, J. K. Heath, D. D. Donaldson et al. // *Nature.* – 1988. – Vol. 336. – P. 688–690.
127. Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing / K. Schmidt-Bleek, H. Schell, J. Lienau et al. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2014. – Vol. 8, № 2. – P. 120–130.
128. Insight into the molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model / J. Lienau, K. Schmidt-Bleek, A. Peters et al. // *Tissue Eng. Part A.* – 2010. – Vol. 16. – P. 191–199.
129. Interactions between bone cells and biomaterials: An update / S. Beauvais, O. Drevelle, J. Jann et al. // *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* – 2016. – Vol. 1, № 8. – P. 227–263.
130. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering / H. Yoshikawa, N. Tamai, T. Murase et al. // *J. R. Soc. Interface.* – 2009. – Vol. 6. – P. 341–348.

131. Interleukin-6 signaling regulates hematopoietic stem cell emergence / R. Tie, H. Li, S. Cai et al. // *Exp. Mol. Med.* 2019. – Vol. 51, № 10. – P. 1–12.
132. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? / J. Street, D. Winter, J. H. Wang et al. // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2000. – Vol. 378. – P. 224–237.
133. Jang, Y.-Y. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche / Y.-Y. Jang, S. J. Sharkis // *Blood.* – 2007. – Vol. 110, № 8. – P. 3056–3063.
134. Johnson, A. J. W. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair / A. J. W. Johnson, B. A. Herschler // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 1, № 7. – P. 16–30.
135. Kasprzak, A. Role of Endoglin (CD105) in the Progression of Hepatocellular Carcinoma and Anti-Angiogenic Therapy / A. Kasprzak, A. Adamek // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 12. – P. 3887.
136. Kfoury, Y. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche / Y. Kfoury, T. David, D. T. Scadden // *Cell Stem Cell.* 2015. – Vol. 16. – P. 239–253.
137. Kolf, C. M. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation / C. M. Kolf, E. Cho, R. S. Tuan // *Arthritis Res. Ther.* – 2007. – Vol. 9, № 1. – P. 204–219.
138. Konopleva, M. Y. Leukemia stem cells and microenvironment: Biology and therapeutic targeting / M. Y. Konopleva, C. T. Jordan // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 591–599.
139. Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate / H. M. Kronenberg // *Nature.* – 2003. – Vol. 423. – P. 332–336.
140. Labisia pumila regulates bone-related genes expressions in postmenopausal osteoporosis model / S. N. Fathilah, N. Mohamed, N. Muhammad et al. // *BMC Complement Altern. Med.* – 2013. – Vol. 13. – P. 217.
141. Lapidot, T. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells / T. Lapidot, I. Petit // *Experimental Hematology.* – 2002. – Vol. 30, № 9. – P. 973–981.

142. Layton, J. E. The interaction of G-CSF with its receptor / J. E. Layton, N. E. Hall // *Front Biosci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 3181–3189.
143. Le Geros, R. Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine / R. Z. Le Geros // *Monogr. Oral Sci.* – 1991. – Vol. 15. – P. 1-201.
144. Li, L. Stem cell niche: Structure and function / L. Li, T. Xie // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2005. – 21. – P. 605–631.
145. Lichtman, M. A. The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review / M. A. Lichtman // *Exp. Hematol.* – 1981. – Vol. 9, № 4. – P. 391–410.
146. Lieberman, J. R. Bone Dynamics, Bone Regeneration and Repair / J. R. Lieberman, G. E. Friedlaender. – Switzerland: SpringerLink, 2005. – 398 p.
147. Lippincott, U. M. Fundamental and Clinical Bone Physiology / U. M. Lippincott - United States of America: Lippincott Williams & Wilkins, 1980. – 416 p.
148. Loss and rescue of osteocalcin and osteopontin modulate osteogenic and angiogenic features of mesenchymal stem/stromal cells / M. S. Carvalho, J. C. Silva, C. M. Hoff et al. // *J. Cell Physiol.* – 2020. – Vol. 235, № 10. – P. 7496–7515.
149. Lucas, D. The Bone Marrow Microenvironment for Hematopoietic Stem Cells / D. Lucas // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – Vol. 1041. – P. 5–18.
150. Mackie, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture / E. J. Mackie // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 35. – P. 1301–1305.
151. Madonna, R. Adipose tissue: A new source for cardiovascular repair / R. Madonna, R. De Caterina // *J. Cardiovasc. Med.* – 2010. – Vol. 11. – P. 71–80.
152. Malizos, K. N. The healing potential of the periosteum molecular aspects / K. N. Malizos, L. K. Papatheodorou // *Injury.* – 2005. – Vol. 36, № 3. – P. 13–19.
153. Marie, P. J. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets / P. J. Marie, M. Kassem // *Eur. J. Endocrinol.* – 2011. – Vol. 165. – P. 1–10.

154. Marsell, R. The biology of fracture healing / R. Marsell, T.A. Einhorn // *Injury*. – 2011. – Vol. 42. – P. 551–555.
155. Masouridi-Levrat, S. Immunological Basis of Bone Marrow Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation / S. Masouridi-Levrat, F. Simonetta, Y. Chalandon // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 362.
156. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates / J. Fu, Y. Wang, M.T. Yang et al. // *Nat. Methods*. – 2010. – Vol. 7, № 9. – P. 733–736.
157. Mechanisms of ectopic bone formation by human osteoprogenitor cells on CaP biomaterial carriers / Y. C. Chai, S. J. Roberts, E. Desmet et al. // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 11, № 33. – P. 3127–3142.
158. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure / M. V. Chaikina, N. F. Uvarov, A. S. Ulihin et al. // *Problems of Materials Science*. – 2008. – Vol. 2, № 54. – P. 219–232.
159. Meirelles, L. D. S. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / L. D. S. Meirelles, P. C. Chagas, N. B. Nardi // *J. Cell Sci.* – 2006. – Vol. 119. – P. 2204–2213.
160. Meng, J. Cell adhesive spectra along surface wettability gradient from superhydrophilicity to superhydrophobicity / J. Meng // *Sci. China Chem.* – 2017. – Vol. 5, № 60. – P. 614–620.
161. Merolli, A. Hard tissues structures and functionality. Biomimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials. 1st. Wiley / A. Merolli, L. P. Tranquilli, M. Santin – United States of America: Wiley Online Library, 2012.
162. Merolli, A. Role of phosphatidyl-serine in bone repair and its technological exploitation / A. Merolli, M. Santin // *Molecules*. – 2009. – Vol. 14, № 12. – P. 5367–5381.
163. Mesenchymal stromal cells induce a permissive state in the bone marrow that enhances G-CSF-induced hematopoietic stem cell mobilization in mice / E. J. F. M. de Kruijf, R. Zuijderduijn, M. C. Stip et al. // *Exp. Hematol.* – 2018. – Vol. 64, № 59-70. – P. 2.

164. Micro-Nano Bioactive Glass Particles Incorporated Porous Scaffold for Promoting Osteogenesis and Angiogenesis in vitro / T. Tian, W. Xie, W. et al. // *Front. Chem.* – 2019. – Vol. 7. – P. 186.
165. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. // *Cytotherapy.* – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315–317.
166. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure / J. L. Abkowitz, A. E. Robinson, S. Kale et al. // *Blood.* – 2003. Vol. 102, № 4. – P. 1249–1253.
167. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis / Z. S. Ai-Aql, A. S. Alagl, D. T. Graves et al. // *J. Dent. Res.* – 2008. – Vol. 87, № 2. – P. 107–118.
168. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction / Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka et al. // *Nat. Med.* – 2006. – Vol. 12. – P. 459–465.
169. Morales-Mantilla, D. E. The Role of Interferon-Gamma in Hematopoietic Stem Cell Development, Homeostasis, and Disease / D. E. Morales-Mantilla, K. Y. King // *Curr. Stem Cell Rep.* – 2018. – Vol. 4, № 3. – P. 264–271.
170. Morphometric immunohistochemical examination of the inflammatory tissue reaction after implantation of calcium phosphate-coated titanium plates in rats / U. Walschus, A. Hoene, H.-G. Neumann et al. // *Acta Biomater.* – 2009. – Vol. 2, № 5. – P. 776–784.
171. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno et al. // *Tissue Eng.* – 2001. – Vol. 7. – P. 211–226.
172. Nakamura-Ishizu, A. Hematopoietic stem cell niche: an interplay among a repertoire of multiple functional niches / Nakamura-Ishizu A., Suda T. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830, № 2. – P. 2404–2409.
173. Nicola, N.A. Leukemia inhibitory factor (LIF) / N. A. Nicola, J. J. Babon // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2015. – Vol. 26, № 5. – P. 533–544.

174. Nonwoven Polylactide Scaffolds Obtained by Solution Blow Spinning and the In Vitro Degradation Dynamics / S. I. Tverdokhlebov, K. S. Stankevich, E. N. Bolbasov et al. // *Adv. Materials Res.* – 2014. – Vol. 872. – P. 257–263.
175. Novel Concepts of “Niche-Relief” and “Niche-Voltage” for Stem Cells as a Base of Bone and Hematopoietic Tissues Biomimetic Engineering / I. A. Khlusov, Yu. Dekhtyar, M. Yu. Khlusova et al. // *IFMBE Proc.* – 2013. – Vol. 38. – P. 99–102.
176. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice / E. C. Walker, N. E. McGregor, I. J. Poulton et al. // *The Journal of clinical investigation.* – 2010. – Vol. 120. – P. 582–592.
177. Osteoblast Sorting and Intracellular Staining of CXCL12 / W. Wang, G. Majihail, C. Lui et al. // *Bio Protoc.* – 2018. – Vol. 8, № 10. – P. e2858.
178. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche / L. M. Calvi, G. B. Adams, K. W. Weibrecht et al. // *Nature.* – 2003. – Vol. 425, № 6960. – P. 841–846.
179. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism / M. C. Walsh, N. Kim, Y. Kadono et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 33–63.
180. Osteointegration of porous absorbable bone substitutes: A systematic review of the literature M. J. E Paulo., M. A. Dos Santos, B. Cimatti et al. // *Clinics (Sao Paulo).* – 2017. – Vol. 72, № 7. – P. 449–453.
181. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size / S. Stier, Y. Ko, R. Forkert et al. // *J. Exp. Med.* – Vol. 2005. – Vol. 201, № 11. – P. 1781–1791.
182. Osteosynthesis with autologous dual bone graft for nonunion of midshaft clavicle fractures: clinical and radiological outcomes / S. Lim, E. Cho, J. M. Chun et al. // *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* – 2021.
183. Paital, S. R. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: materials, performance factors, and methodologies / S. R. Paital, N. B. Dahotre // *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* – 2009. – Vol. 1–3, № 66. P. 1–70.

184. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells / D. E. Wright, A. J. Wagers, A. P. Gulati et al. // *Science*. – 2001. – Vol. 294, № 5548. P. 1933–1936.
185. Pietras, E. M. Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease / E. M. Pietras // *Blood*. – 2017. – Vol. 130. – P. 1693–1698.
186. Planell, J. A. (2010) Advances in Regenerative Medicine: Role of Nanotechnology, and Engineering Principles, Materials surface effects on biological interactions / J. A. Planell. - Switzerland: SpringerLink, 2010. – 252 p.
187. *Pten* Cell Autonomously Modulates the Hematopoietic Stem Cell Response to Inflammatory Cytokines / S. N. Porter, A. S. Cluster, R. A. Signer et al. // *Stem cell reports*. – 2016. – Vol. 6, № 6. – P. 806–814.
188. Purton, L. E. The hematopoietic stem cell niche / L. E. Purton, D. T. Scadden. - Cambridge: Harvard Stem Cell Institute, 2008. – 14 p.
189. Ratushnyy, A. Expansion of adipose tissue-derived stromal cells at “physiologic” hypoxia attenuates replicative senescence / A. Ratushnyy, M. Lobanova, L. B. Buravkova // *Cell Biochem. Funct.* – 2017. – Vol. 35. – P. 232–243.
190. Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone / A. Abzhanov, S. J. Rodda, A. P. McMahon et al. // *Development*. – 2007. – Vol. 134. – P. 3133–3144.
191. Riggs, B. L. Osteoporosis: Etiology, diagnosis, and management. 2nd ed. / B. L. Riggs, III L. J. Melton. – Philadelphia, New York: Lippincott-Raven Publ, 1995. – 220 p.
192. Roberts, T. T. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing / T. T. Roberts, A. J. Rosenbaum // *Organogenesis*. – 2012. – Vol. 8, № 4. – P. 114–124.
193. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension / T. P. Mikolajczyk, R. Nosalski, P. Szczepaniak et al. // *FASEB J.* – 2016. - Vol. 30, № 5. – P. 1987–1999.

194. Role of the Complement System in the Response to Orthopedic Biomaterials / Y. Mödinger, G. Q. Teixeira, C. Neidlinger-Wilke et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 11. P. 3367.
195. Rose-John, S. Interleukin-6 signalling in health and disease / S. Rose-John // *F1000Res.* – 2020. – Vol. 9. – P. 1000.
196. Ryan, G. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications / G. Ryan, A. Pandit, D. P. Apatsidis // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27. – P. 2651–2670.
197. Saalbach, A. Thy-1: more than a marker for mesenchymal stromal cells / A. Saalbach, U. Anderegg // *FASEB J.* – 2019. – Vol. 33, № 6. – P. 6689–6696.
198. Sathyanarayana, P. Erythropoietin modulation of podocalyxin and a proposed erythroblast niche / P. Sathyanarayana, M. P. Menon., O. Bogacheva et al. // *Blood.* – 2007. – V. 110, № 2. – P. 509–518.
199. Scadden, D. T. The stem-cell niche as an entity of action / D. T. Scadden // *Nature.* – 2006. – Vol. 441. – P. 1075–1079.
200. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the hematopoietic stem cell. A hypothesis / R. Schofield // *Blood Cells.* – 1978. – Vol. 4, № 1–2. – P. 7–25.
201. Senescence of mesenchymal stem cells / Y. Li, Q. Wu, Y. Wang et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2017. – Vol. 39. – P. 775–782.
202. Sequentially-crosslinked biomimetic bioactive glass/gelatin methacryloyl composites hydrogels for bone regeneration / J. Zheng, F. Zhao, W. Zhang et al. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* - 2018. – Vol. 89. – P. 119–127.
203. Shadanbaz, S. Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review / S. Shadanbaz, G.J. Dias // *Acta Biomater.* – 2012. – Vol. 1, № 8. – P. 20–30.
204. Simons, B. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues / B. Simons, H. Cleavers // *Cell.* – 2011. – Vol. 1454. – P. 851–862.
205. Sims, N.A. Leukemia inhibitory factor: a paracrine mediator of bone metabolism / N. A. Sims, R. W. Johnson // *Growth factors.* – 2012. – Vol. 30. – P. 76–87.

206. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo / S. A. Kuznetsov, P. H. Krebsbach, K. Satomura et al. // *J. Bone Miner. Res.* – 1997. – Vol. 12. – P. 1335–1347.
207. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells / M. J. Kiel, O. H. Yilmaz, T. Iwashita et al. // *Cell.* – 2005. – Vol. 121, № 7. – P. 1109–1121.
208. Smith, J. N. P. Current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells / J. N. P. Smith, L. M. Calvi // *Stem cells.* – 2013. – Vol. 31. – P. 1044–1050.
209. Spontaneous and inducible production of leukaemia inhibitory factor by human bone marrow stromal cells / V. Lorgeot, F. Rougier, P. Fixe et al. // *Cytokine.* – 1997. – Vol. 9, № 10. – P. 754–758.
210. Spychala, J. Wnt and beta-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation / J. Spychala, J. Kitajewski // *Exp. Cell. Res.* – 2004. – Vol. 296. – P. 99–108.
211. Stevenson, S. The response to bone allografts / S. Stevenson, M. Horowitz // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 1992. – Vol. 74, № 610 – P. 939–950.
212. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) / P. Bourin, B. A. Bunnell, L. Casteilla et al. // *Cytotherapy.* – 2013. – Vol. 15. – P. 641–648.
213. Suchanek, W. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants / W. Suchanek, M. Yoshimura // *J. Mater. Res.* – 1998. – Vol. 1, № 13. – P. 94–117.
214. Suda, T. Hematopoietic stem cells and their niche / T. Suda, F. Arai, A. Hirao // *Trends Immunol.* – 2005. Vol. 26, № 8. – P. 426–433.
215. Surmenev, R.A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – a review / R. A. Surmenev, M. A. Surmeneva, A. A. Ivanova // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol. 2, № 10. – P. 557–579.

216. Taichman, R. S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche / R. S. Taichman // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, № 7. – P. 2631–2639.
217. Taichman, R. S. The Hematopoietic Microenvironment: Osteoblasts and The Hematopoietic Microenvironment / R. S. Taichman, M. J. Reilly, S. G. Emerson // *Hematology*. – 2000. – Vol. 4, № 5. – P. 421–426.
218. Takizawa, H. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation / H. Takizawa, S. Boettcher, M. G. Manz // *Blood*. – 2012. – Vol. 119, № 13. – P. 2991–3002.
219. Tasian, S. K. Targeting Leukemia Stem Cells in the Bone Marrow Niche / S. K. Tasian, M. Bornhäuser, S. Rutella // *Biomedicines*. – 2018. – Vol. 6, № 1. – P. 22.
220. Terskikh, V. V. Stem cell niches / V. V. Terskikh, A. V. Vasiliev, E. A. Vorotelyak // *Biology Bulletin*. – 2007. – T. 34, № 3. – P. 211–220.
221. The biology of bone grafting / S. N. Khan, Jr F. P. Cammisa, H. S. Sandhu et al. // *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* – 2005. – Vol. 13, № 1. – P. 77–86.
222. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization / H. G. Kopp, S. T. Avecilla, A. T. Hooper et al. // *Physiology (Bethesda)*. – 2005. – Vol. 20, № 5. – P. 349–356.
223. The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings / D. O. Costa, P. D. H. Prowse, T. Chrones et al. // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 30, № 34. – P. 7215–7226.
224. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing / P. Kolar, K. Schmidt-Bleek, H. Schell et al. // *Tissue Eng. Part B Rev.* – 2010. – Vol. 16. – P. 427–34.
225. The evolving role of bone-graft substitutes / A. S. Greenwald, S. D. Boden, R. L. Barrack et al. - New Orleans, Louisiana: Proceedings of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 77th Annual Meeting, 2010. – 6 p.
226. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult / X. Gao, C. Xu, N. Asada et al. // *Development*. – 2018. – Vol. 145, № 2. – P. dev139691.

227. The Interplay between the bone and the immune system / G. Mori, P. D'Amelio, R. Faccio et al. // *Clin. Dev. Immunol.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 720504.
228. The osteoblastic niche in the context of multiple myeloma / D. Toscani, M. Bolzoni, F. Accardi et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015. – Vol. 1335. – P. 45–62.
229. The Role of Osteoprotegerin and Its Ligands in Vascular Function / L. Rochette, A. Meloux, E. Rigal et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 705.
230. Therapeutic targeting of a stem cell niche / G. B. Adams, R. P. Martin, I. R. Alley et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 238–243.
231. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche / F. Arai, A. Hirao, M. Ohmura et al. // *Cell.* – 2004. – Vol. 118, № 2. – P. 149–161.
232. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance / M. Fröhlich, W. L. Grayson, L. Q. Wan et al. // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* – 2008. – Vol. 3, № 4. – P. 254–264.
233. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue / L. Xu, Y. Liu, Y. Sun et al. // *Stem Cell Res. Ther.* – 2017. – Vol. 8. – P. 275.
234. Toll-like receptor 4 in lymphatic endothelial cells contributes to LPS-induced lymphangiogenesis by chemotactic recruitment of macrophages / S. Kang, S. P. Lee, K. E. Kim et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 113. – P. 2605–2613.
235. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment / Y. Nagai, K. P. Garrett., S. Ohta et al. // *Immunity.* – 2006. – Vol. 24. – P. 801–812.
236. Tornetta, III P. Rockwood and Green's fractures in Adults / III P. Tornetta, W. M. Ricci, R. F. Ostrum. – United States of America: Wolters Kluwer, 2019. – 4100 p.

237. Transplantation of embryonic stem cells-derived endothelial cells in rat stroke model promotes functional recovery / J. C. F. Wu, Z. Li, L. Xu et al. // *Circulation Research*. – 2006. – Vol. 99. – P. E49.
238. Trentin, J. J. Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM) / J. J. Trentin // *Am. J. Pathol.* – 1971. – Vol. 65. – P. 621–628.
239. Tsiridis, E. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? / E. Tsiridis, N. Upadhyay, P. Giannoudis // *Injury*. – 2007. – Vol. 38, № 1. – P. 11–25.
240. Type I IFNs drive hematopoietic stem and progenitor cell collapse via impaired proliferation and increased RIPK1-dependent cell death during shock-like ehrlichial infection / J. N. P. Smith, Y. Zhang, J. J. Li et al. // *PLoS Pathog.* – 2018. – Vol. 14, № 8. – P. 1007234.
241. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface / A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol et al. // *Nat. Mater.* – 2009. – Vol. 8, № 7. – P. 543–557.
242. Vascular Morphogenesis in the Context of Inflammation: Self-Organization in a Fibrin-Based 3D Culture System / B. M. Rüger, T. Buchacher, A. Giurea et al. // *Front. Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 679.
243. Wang, L. D. Dynamic niches in the origination and differentiation of hematopoietic stem cells / L. D. Wang, A. J. Wagers // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 12. – P. 643–655.
244. Wang, W. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review / W. Wang, K. W. K. Yeung // *Bioact. Mater.* – 2017. – Vol. 2, № 4. – P. 224–247.
245. Wechsler, M. E. Adult Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation at the Cell Population and Single-Cell Levels Under Alternating Electric Current / M. E. Wechsler, B. P. Hermann, R. Bizios // *Tissue Eng. Part C Methods*. – 2016. – Vol. 22, № 2. – P. 155–164.
246. What does the concept of the stem cell niche really mean today? / A. D. Lander, J. Kimble, H. Clevers et al. // *BMC Biology*. – 2012. – Vol. 10. P. 19.

247. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility / D. F. Williams // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29, № 20. – P. 2941–2953.
248. Wilson, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches / A. Wilson, A. Trumpp // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 93–106.
249. Yang, Y. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process - an alternative to plasma spraying / Y. Yang, K.-H. Kim, J. L. Ong // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 3, № 26. – P. 327–337.
250. Yin, T. The stem cell niches in bone / T. Yin, L. Li // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116, № 5. – P. 1195–1201.
251. Zaidi, M. Skeletal remodeling in health and disease / M. Zaidi // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13, № 7. – P. 791–801.
252. Zhao, M. Regulation of hematopoietic stem cells in the niche / M. Zhao, Li L. // *Sci. China Life Sci.* – 2015. – Vol. 58, № 12. – P. 1209–1215.
253. Zhou, H. Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review / H. Zhou, J. G. Lawrence, S. B. Bhaduri // *Acta Biomater.* – 2012. – Vol. 6, № 8. – P. 1999–2016.
254. Zipori, D. Stromal cells from the bone marrow: evidence for a restrictive role in regulation of hemopoiesis / D. Zipori // *Eur. J. Hematol.* – 1989. – Vol. 42, № 3. – P. 225–322.