

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор, ведущий научный
сотрудник лаборатории
иммунологии воспаления ФГБУН
«Институт иммунологии и
физиологии» УрО РАН

Зурочка Александр Владимирович

доктор медицинских наук,
профессор кафедры органической
химии ФГАОУ ВО НИ ТГУ
Минобрнауки России

Чурина Елена Георгиевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)

Защита состоится ___ _____ в ___ ч на заседании диссертационного совета 21.2.068.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Мультипотентные мезенхимные 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 [Ardeshirylajimi 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 [Neo 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., Katz A.J., Bunnell V.A., 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 [Ratushnyu 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 гемопозитические 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, остеопонтина, 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; Hojo H. et al., 2017], для реализации разных этапов кроветворения, остеогенеза/osteолизиса 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, дифференцирующихся в остеобласты в трехмерной модели дистантного культивирования *in vitro*, в формировании клеточных и гуморальных факторов гемопоэзиндуцирующего 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 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 мезенхимных 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 гемопоэзидуцирующего 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 мезенхимных 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 мультипотентных мезенхимных стромальных/стволовых клеток жировой ткани человека, 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.
8. Определение общей площади трёхмерных островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) и числа клеток с морфологией кроветворных в культурах ММСК 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).

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.

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).

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Материалом для исследования служила культура мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток, полученных из жировой ткани человека (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 22.03.2021г.

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

Схема дизайна исследования представлена на **рисунке 1**.

Экспериментальные образцы имплантатов с микродуговым КФ покрытием, используемых в настоящем эксперименте [Terleeva O.P. et al., 2010] были изготовлены в электролите из наночастиц гидроксипатита (ГАП) в институте физики прочности и материаловедения СО РАН (Томск). 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) ВТ1.0, имеющих размер 10x10x1 мм³ и несущих рельефное (индекс шероховатости Ra=2,0–3,0 мкм) микродуговое двустороннее КФ покрытие. 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.

Культура ММСК-ЖТ была получена из липоаспирата жировой ткани условно здорового 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 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 International Society for Cellular Therapy (ISCT) [Dominici M. et al., 2006].

Подсчет общего количества клеток (ОКК) в культурах ММСК осуществляли на автоматическом счётчике клеток (Countess™ Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с использованием красителя трипанового синего 0.4% (Trypan blu) («Invitrogen», США). Результаты анализа выражали в 10^6 кл/мл. Для регистрации уровня живых и мертвых клеток в исследуемых клеточных культурах, использовали метод проточной лазерной цитометрии с использованием проточного цитометра «MACSQuantAnalyzer» («Miltenyi Biotec», Германия).

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 среды (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). 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). Результаты окрашивания монослоя клеточной культуры ММСК оценивали с использованием светового микроскопа. Интенсивность окраски сравнивали с интактной культурой при культивировании с использованием ППС без дифференцировочных добавок.

Для фенотипической идентификации культур ММСК до и после культивирования в разных условиях (2D модель, 3D модель), проводили детекцию основных маркеров ММСК (CD105, CD73, CD90) и гемопоэтических (CD45, CD14, CD20, CD34) клеток. Иммунофенотипирование клеток осуществляли с использованием набора MSC Phenotyping Kit human («Miltenyi Biotec», Германия). Анализ и обработку изображений с проточного цитометра проводили с использованием автоматического программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США).

Определение уровней относительной экспрессии гена *ALPL* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя реагенты qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфические зонды TaqMan и праймеры (10 пМ) («Beagle», Россия). Референсным геном служил *RPLPO*. Специфичность праймеров и зондов была проведена путём выравнивания на целевые гены, с использованием программы Primer BLAST.

Последовательность олигонуклеотидных праймеров: используемых в эксперименте:

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

Количественный уровень биологически активных молекул (IFN α , IFN γ , IL-6, IP-10, TNF α , RANTES, TRAIL, LIF, SCF и G-CSF) оценивали методом проточной флуориметрии, на двухлучевом лазерном автоматическом анализаторе (Bio-Plex® 200 Systems, «Bio-Rad», США), используя коммерческие тест-системы (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay, «Bio-Rad», США). По стандартной кривой (динамический диапазон составлял 2-32 000 пг/мл) определяли концентрацию исследуемых молекул. *Результаты выражали в пг/мл.*

Количественное определение содержания остеокальцина проводили методом иммуноферментного анализа, 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.*

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% CO $_2$, 21 день, при смене полной питательной 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 ППС 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. 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. 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. и соавт., 2004; Автандилов Г.Г., 2006]. Очаги минерализации были выделены с использованием инструмента «Волшебная палочка», для каждого центра минерализации индивидуально подбирался допуск инструмента на основании цветовой характеристики минерализата). После проведения измерений, площадь каждого трехмерного очага/узелка минерализата заносилась в таблицу, а его границы окрашивались в зеленый/лиловый цвет, для визуализации обведенных участков. Так

как съемка 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/узлов выражали в $\text{мм}^2 / \text{см}^2$ поверхности лунки планшета (площадь поверхности лунки планшета составляет 4 см^2) (рисунок). Число клеток с морфологией кроветворных на микрофотографиях (размер фото - $1,51 \text{ мм}^2$) окрашенных культур ММСК подсчитывали на поверхности лунки планшета на пластике, около образовавшихся трёхмерных очагов/узлов минерализации (очаги с окраской ализариновым красным). Для оптимизации подсчёта и представления полученных данных, вводили поправочные коэффициенты; результаты выражали в виде количества клеток на мм^2 поверхности площади лунки планшета.

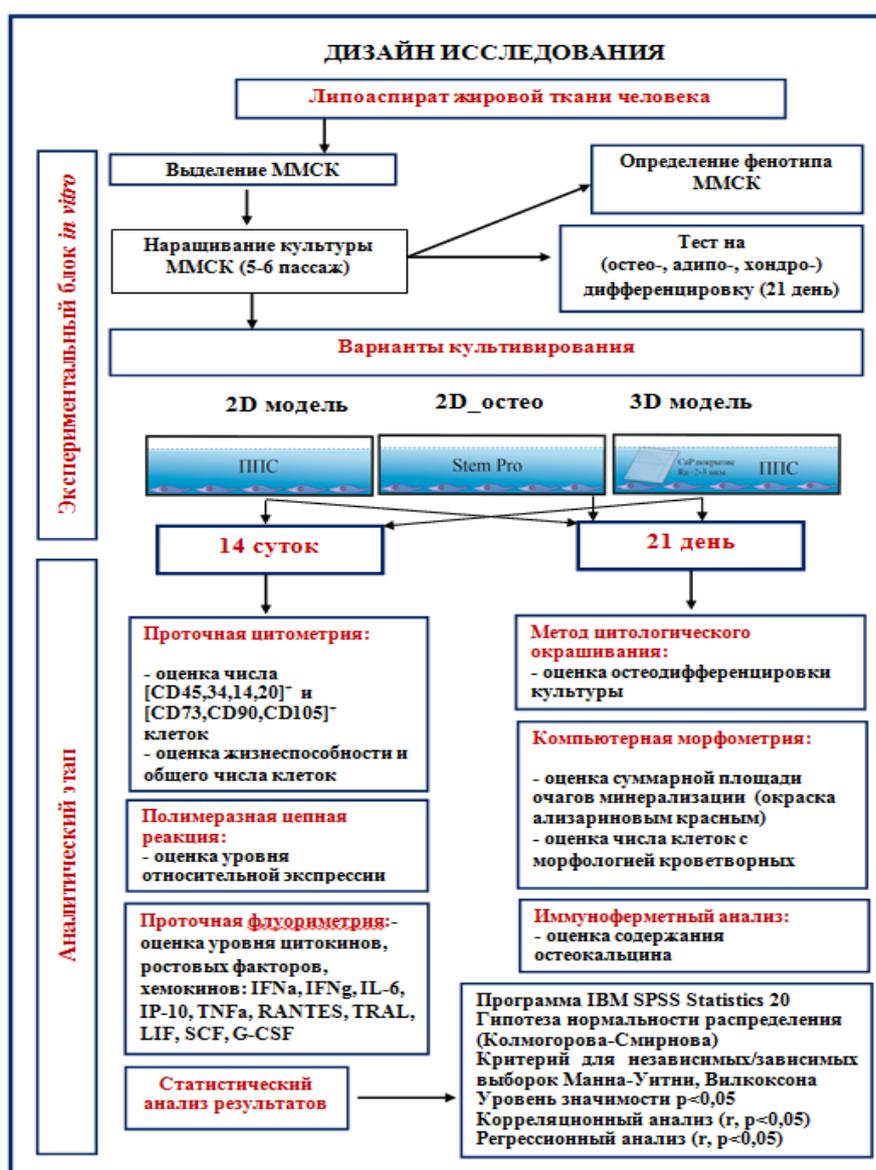


Рисунок 1 – Схема дизайна исследования

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 (r) [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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Симулировать *in vitro* структурно-функциональное состояние эндоста в различные фазы ремоделирования костной ткани возможно с помощью сокультивирования мультипотентных мезенхимных стромальных/стволовых клеток (ММСК) на подложках с рельефным кальцийфосфатным (КФ) покрытием. 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.

В проведенном нами исследовании, направленном на оценку функциональной роли ММСК в условиях *in vitro* моделирования экспериментальной системы "регенерирующая кость/кроветворное 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 и CD90 (таблица 1). 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 [Netsch P. et al., 2018; Saalbach A., Anderegg U., 2019]. 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) представляет собой трансмембранный гликопротеин, один из корецепторов трансформирующего фактора роста β (TGF-β) [Shi D. et al., 2019; Brum S.T. 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 биодеградации) влиянием искусственного КФ матрикса.

Таблица 1 – Фенотипические характеристики культур мультипотентных мезенхимных стромальных/стволовых клеток 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
[CD45,34,14,20] ⁺	0,28 (0,26-0,38)	0,78 (0,60-0,91) <i>p</i> < 0,05
[CD73] ⁺	95,83 (94,91-96,11)	93,21 (93,11-94,81) <i>p</i> < 0,05
[CD90] ⁺	98,65 (98,52-98,81)	97,41 (96,65-97,79) <i>p</i> < 0,05
[CD105] ⁺	98,92 (98,77-99,11)	97,23 (97,03-98,35)

Примечание: здесь и в таблицах 2,3: *p* - уровень значимости различий с соответствующей группой (2D модель), *n* – число проб

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 2**). 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 Ca²⁺, 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 молекулу CD105 (*r*=0,76, *p*<0,05), может быть интерпретирована тем, что эндоглин активирует экспрессию морфогенетического белка кости BMP-2, играющего ключевую роль в дифференцировке остеобластов, способствуя, в том числе, увеличению активности *ALPL* [Wu S. et al., 2018]. 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 3D модели. Согласно ранее высказанной гипотезе о существовании в рельефе КФ микродуговых покрытий искусственных 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; Bernardo M.E., Fibbe W.E., 2013; Czekanska E.M. et al., 2014].

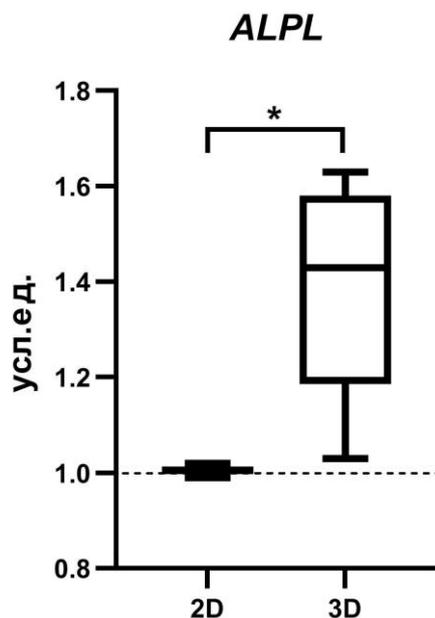


Рисунок 2 - Изменение относительного уровня (усл.ед.) транскрипции мРНК гена *ALPL* (щелочная фосфатаза) в культурах ММСК в условиях сокультивирования *in vitro* с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм), срок культивирования - 14 дней

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 гемопоэтических клеток. Активность ММСК в 2D культуре, в отношении секреции сигнальных молекул после 14-суточного культивирования, 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. подобный профиль секретируемых факторов с балансом активаторов клеточной жизнедеятельности и их гибели, на наш взгляд, может обуславливать наличие кроветворных клеток в 2D культуре (таблицы 2, 3).

На 14 сутки культивирования, в супернатантах 3D культур, нами было выявлено статистически значимое снижение (в среднем, в 2,5 раза относительно аналогичных показателей 2D культуры) содержания провоспалительных медиаторов (в частности, IFN γ , IL-6, IP-10 и TNF- α , но не IFN- α) и проапоптотического фактора TRAIL (таблица 2). 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]. 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]. В то же время запуск апоптоза клеток интерферонами может быть активирован напрямую, либо посредством индукции каспазы-1, FAS и TRAIL [Masouridi-Levrat S. et al., 2016]. Последний является членом суперсемейства TNF и взаимодействует с рецепторами суперсемейства TNF [Rochette L. et al., 2019]. В свою очередь, IFN- γ индуцируемый белок-10 (IP-10, CXCL10), провоспалительный хемокин [Mamishi S. et al., 2019], эндогенно ингибирует образование ГСК из плюрипотентных клеток, через взаимодействие с CXCR3 рецепторами [Rahman N. et al., 2017]. IL-6 - плейотропный провоспалительный цитокин [Tie R. et al., 2019; Rose-John S., 2020] также участвует в регуляции гемопоза, метаболизме костной ткани, эмбриональном развитии и других фундаментальных процессах [Tie R. et al., 2019; Sovkova V. et al., 2021].

Таблица 2 – Содержание факторов с провоспалительной (IFNa, IFNg, IL-6, IP-10, TNFa), хемоаттрактантной (RANTES) и проапоптотической (TRAIL) активностью в супернатантах культур мультипотентных мезенхимных стромальных/стволовых клеток 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) p < 0,05
IL-6, пг/мл	484,83 (459,375-510,915)	380,03 (286,87-439,16) p < 0,05
IP-10, пг/мл	19,25 (16,595-48,46)	8,23* (7,21-9,33) p < 0,05
TNFa, пг/мл	15,53 (10,33 – 32,12)	3,94 (1,99 - 4,82) p < 0,05
TRAIL, пг/мл	4,37 (3,04-5,37)	2,71 (2,49-2,81) p < 0,05
RANTES, пг/мл	11,66 (4,09 – 15,32)	32,82 (18,35 – 75,15) p < 0,05

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 TNFa (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 то же время, выявленное нами в среде 3D модели 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 может также свидетельствовать о синтезе этого хемокина остеобластами. 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 культурах, может свидетельствовать о протекторном действии этого хемокина в отношении ММСК [Yano S. et al., 2005].

Далее, наряду с продукцией провоспалительных факторов, в экспериментальных культурах ММСК нами были проанализированы концентрации некоторых медиаторов, оказывающих влияние на жизнедеятельность кроветворных клеток. 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 3**).

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 свою очередь LIF, в основном, продуцируется регуляторными Т-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, ограничивая их дифференцировку; обеспечивает стимуляцию пролиферации миелоидных клеток и мегакариопоэза, а также стимулирует дифференцировку ММСК в остеобласты (но не в адипоциты) [Sims N.A., Johnson R.W., 2012; Nicola N.A., Babon J.J., 2015].

На наш взгляд, 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).

Таблица 3 – Содержание гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF) в супернатантах культур мультипотентных мезенхимных стромальных/стволовых клеток в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования - 14 дней), Ме ($Q_1 - Q_3$)

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) $p < 0,05$
SCF, пг/мл	3,92 (3,61-4,66)	11,27 (4,68-11,3) $p < 0,05$
G-CSF, пг/мл	15,83 (14,47-63,61)	24,39 (15,82-36,31) $p < 0,05$

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) (**таблица 4**). 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 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) (таблица).

Таблица 4 – Суммарная площадь островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) в культурах мультипотентных мезенхимных стромальных/стволовых клеток в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования – 21 день), Ме (Q₁ - Q₃)

Показатели	Варианты культивирования ММСК		
	2D модель <i>n</i> 1=35	2D модель_остео <i>n</i> 1=35	3D модель <i>n</i> 1=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) <i>p</i>1 < 0,001	2,74 (1,75 – 4,77) <i>p</i>1 < 0,001 <i>p</i>2 < 0,05

Примечание: здесь и в таблицах 5, 6: **p1** - уровень значимости различий с соответствующей с группой - 2D модель, **p2** - уровень значимости различий с группой - 2D модель_остео; **n1** - число снимков

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 5).

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 3). Важно отметить, что увеличение суммарной площади трёхмерных островков/узелков минерализации на пластике в экспериментальной 3D культуре 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 клеток с морфологией кроветворных ($r=0,90$, $p<0,05$). Увеличение уровня остеокальцина, регистрируемое нами на 21 сутки культивирования (таблица 6), в супернатантах экспериментальных 3D культур ММСК относительно значений контроля, может свидетельствовать об инициации процессов формирования внеклеточного костного матрикса [Carvalho M.S. et al., 2020; Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Таблица 5 – Содержание клеток с морфологией кроветворных в культурах мультипотентных мезенхимных стромальных/стволовых клеток в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования – 21 день), Ме (Q₁ - Q₃)

Показатели	Варианты культивирования ММСК		
	2D модель n1=35	2D модель_остео n1=35	3D модель 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

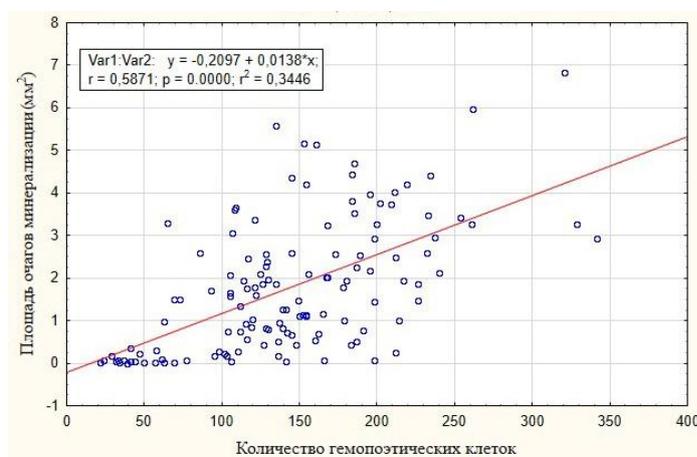


Рисунок 3 – Регрессионная зависимость числа гемопоэтических клеток от суммарной площади трехмерных очагов/узелков минерализации (мм²) на пластике в *in vitro* моделях ММСК

Таблица 6 – Содержание остеокальцина в супернатантах культур мультипотентных мезенхимных 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	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

Подводя итог вышесказанному, КФ покрытие, посредством продуктов биodeградации, активирует *in vitro* дифференцировку части пула ММСК в остеобласты, что сопровождается снижением числа клеток, экспрессирующих маркеры 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 4**).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальное *in vitro* 3D моделирование функционирования мультипотентных мезенхимных стромальных/стволовых клеток жировых 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 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 (**рисунок 4**). Согласно полученным нами результатам, морфофункциональные реакции ММСК 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 являются ключевыми регуляторами нишевых территорий, обеспечивающих формирование костной ткани. Так, согласно полученным нами результатам, остеогенная дифференцировка ММСК 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 4**).

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/кроветворное микроокружение, может стать перспективной стратегией для обеспечения жизнедеятельности и направленного масштабирования клеточных популяций из пула стволовых клеток в *in vitro* условиях, приближенных к физиологическим.

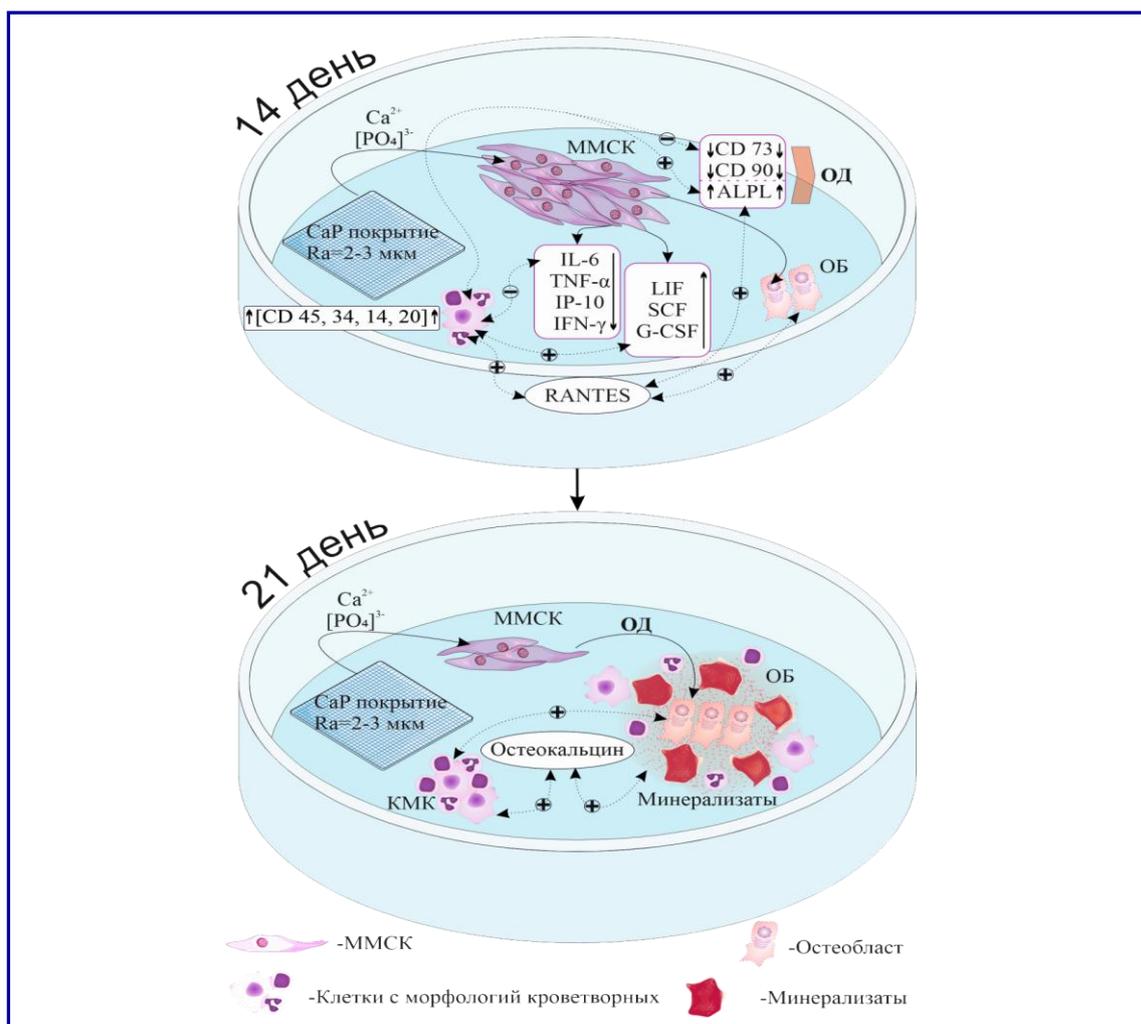


Рисунок 4 - Схема, отражающая клеточные и гуморальные регуляторные механизмы остеогенеза и гемопоэза, в условиях *дистантного in vitro* культивирования ММСК с трёхмерным скаффолдом с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральный матрикс костной ткани

ВЫВОДЫ

1. Мультипотентные мезенхимные 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*, *IFNg* и *TNFa*) 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Melashchenko E.S., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Shupletsova V.V., **Ivanov P.A.**, Khlusov I.A., Litvinova L.S. Cellular and Molecular Basis of Osteoblastic and Vascular Niches in the Processes of Hematopoiesis and Bone Remodeling (A Short Review of Modern Views) // **Current Pharmaceutical Design**. – 2019. – V. 25. – №. 6. – С. 663–669. (Q2 Scopus, SJR = 0.703).
2. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., **Иванов П.А.**, Хлусов И.А., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., Мелашченко Е.С., Литвинова Л.С. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор // **Цитология**. – 2020. – Т. 62. – №. 5. – С. 305-315. (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,721).
3. Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Melashchenko E.S., Khlusova M.Yu., Komarova E.G., Chebodaeva V.V., Sharkeev Yu.P., **Ivanov P.A.**, Khlusov I.A. Secretion of niche signal molecules in conditions of osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells induced by textured calcium phosphate coating // **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry** [this link is disabled](#). – 2019. – Т. 13. – № 4. – P. 341–348 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,608).
4. Litvinova L.S., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., **Ivanov P.A.**, Komarova E.G., Chebodaeva V.V., Porokhova E.D., Gereng E.A., Khlusov I.A. Calcium Phosphate Coating Prepared by Microarc Oxidation Affects hTERT Expression, Molecular Presentation, and Cytokine Secretion in Tumor-Derived Jurkat T Cells // **Materials (Basel)**. – 2020. – Т. 13, № 19. – P. 4307 (Q2 WoS, JCR=2,467).
5. Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Khlusova M.Y., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Todosenko N.M., Norkin I.K., **Ivanov P.A.**, Khlusov I.A. Osteogenic and angiogenic properties of heparin as a system of biomolecule delivery for bone bioengineering: A brief critical review // **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry** [this link is disabled](#). – 2021. – Т. 15. – № 2. – P. 147–152 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,608).
6. Юрова К.А., Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Шаркеев Ю.П., Малащенко В.В., Мелашченко Е.С., **Иванов П.А.**, Шунькин Е.О., Хлусов И.А. Роль 3D-матрикса, имитирующего минеральное вещество регенерирующей костной ткани, в формировании гемопоэтических ниш, обеспечивающих васкуляризацию костной ткани // **Олигомеры-2019**: сборник трудов XVIII Международной конференции по химии и

- физикохимии олигомеров. Тезисы докладов. Т.2. / [отв. ред. - М.П. Березин]. – Черногловка: ИПХФ РАН, 2019. – С. 164– 165.
7. Литвинова Л.С., Юрова К.А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Норкин И.К., Прокин К.И., **Иванов П.А.**, Хлусов И.А. Роль трехмерных матриц, имитирующих регенерирующую костную ткань в формировании пула гемопоэтических стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro* // **Российский иммунологический журнал**. – 2019. – Т. 13 (22), №4. – С. 1555-1557 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,318).
 8. Юрова К. А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Шаркеев Ю.П., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., **Иванов П.А.**, Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Секретия провоспалительных цитокинов клетками, участвующими в регенерации костной ткани // **Гены & Клетки**. – 2019. – Т. XIV (Приложение). – С. 269–270 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,914).
 9. Юрова К.А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., **Иванов П.А.**, Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Влияние 3D-матриц, имитирующих регенерирующую костную ткань, на дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // **Гены & Клетки**. – 2019. - Т. XIV (Приложение). - С. 269 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,914).
 10. Юрова К. А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., **Иванов П.А.**, Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Оценка морфологического состояния мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при культивировании в присутствии трехмерных матриц, имитирующих минеральное вещество регенерирующей костной ткани // **Гены & Клетки**. – 2019. – Т. XIV (Приложение). – С. 268 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,914).
 11. **Иванов П.А.**, Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Норкин И.К., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Роль стволовых / стромальных клеток в регуляции кроветворения в 3d культуре *in vitro* // **Российский иммунологический журнал**. – 2021. - Т. 24, № 2. – С. 153-160 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,318).
 12. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Мелашенко Е.С., Норкин И.К., **Иванов П.А.**, Кривошеев В.В., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Роль компонентов искусственных матриц, применяемых для регенеративной медицины, в борьбе с перипротезной инфекцией // **Гены & Клетки**. – 2021. – Т. XVI, №2. – С.21-33 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,914).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2D (от англ. 2-dimensional) – двумерная культура	LIF – лейкоингибирующий фактор
3D (от англ. 3-dimensional) – трехмерная культура	CaP – кальцийфосфатный
КФ – кальцийфосфатный	CD (англ. cluster of differentiation) –
мРНК – матричная РНК	кластер дифференцировки
ММСК – мультипотентные мезенхимные	G-CSF – гранулоцитарный
стромальные/стволовые клетки	колониестимулирующий фактор
ЩФ – щелочная фосфатаза	RANTES – молекула регуляции активации
ALPL – щелочная фосфатаза	экспрессии и секреции нормальных Т-
IL – интерлейкин	клеток
IFN – интерферон	SCF – фактор стволовых клеток
	TNF – (от англ. tumor necrosis factor) -
	фактор некроза опухоли

Иванов Павел Александрович

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

1.5.5. Физиология человека и животных

Подписано в печать __. __. 2021
формат 60X90 1/16. Усл. печ. листов 0,65. Тираж 100 экз. Заказ №
Отпечатано полиграфическим отделом
Издательства Балтийского федерального университета им. И. Канта
236041, г. Калининград, ул. А. Невского 14