

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

На правах рукописи

Юрова Кристина Алексеевна

**КООПЕРАЦИЯ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И ИММУННЫХ
КЛЕТОК НА IN VITRO МОДЕЛИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук
Лариса Сергеевна Литвинова

Калининград - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	24
1.1. Стромальные стволовые клетки и иммунная регуляция	24
1.2. Особенности взаимодействия костной и иммунной систем	33
1.2.1 Использование ССК для остеорегенерации	38
1.3. Остеобласты	40
1.4. Маркеры метаболизма костной ткани	44
1.5. Процесс физиологического ремоделирования кости	46
1.6. Роль паракринных медиаторов ССК в ангиогенезе костной ткани	54
1.7. Гемопозитические стволовые клетки	58
1.8. Роль экстрацеллюлярного матрикса в жизнедеятельности клеток	62
1.9. Роль искусственного матрикса в механизмах межклеточного взаимодействия	69
1.10. Влияние 3D-культуры клеток на потенциал костной регенерации стромальных стволовых клеток	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	78
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	80
2.1. Объект и материал исследования	80
2.2. Получение культуры иммунокомпетентных клеток из цельной крови человека	81
2.3. Получение культуры стромальных стволовых клеток из липоасpirата жировой ткани человека	83
2.4. Оценка жизнеспособности клеточных культур	84
2.5. Подсчет общего числа клеток в экспериментальных культурах	85
2.6. Детекция дифференцировки стромальных стволовых клеток	86
2.7. Проведение фенотипической идентификации выделенного пула стромальных стволовых клеток	89
2.8. Экспериментальное 2D и 3D культивирование клеток	92
2.8.1. Двухмерная модель культивирования	92
2.8.2. Трехмерная модель культивирования клеток	93
2.8.3. Экспериментальные модели культивирования для выявления остеогенной дифференцировки стромальных стволовых клеток	96
2.9. Оценка морфофункционального состояния (активации, дифференцировки, созревания, пролиферации и гибели) клеточных культур в условиях 2D- и 3D-сокультивирования	98

2.9.1. Определение антигенных детерминант	98
2.9.2. Количественное определение медиаторов, секретируемых клетками	100
2.10. Оценка дифференцировки и созревания клеток	102
2.10.1. Определение относительного уровня экспрессии мРНК исследуемых генов	102
2.10.2. Оценка суммарной площади очагов минерализации и содержания клеток с морфологией кроветворных в разных экспериментальных культурах методом компьютерной морфометрии	109
2.10.3. Определение уровня остеокальцина в супернатантах разных экспериментальных культур методом иммуноферментного анализа	111
2.11. Статистическая обработка результатов	113

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 117

3.1. Количественное определение относительного (%) содержания жизнеспособных, апоптотических и мертвых форм клеток в разных экспериментальных культурах в условиях <i>in vitro</i> в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием	117
3.2. Оценка молекул дифференцировки на клеточной поверхности в разных экспериментальных культурах клеток в условиях <i>in vitro</i> в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием	120
3.3. Анализ продукции медиаторов (хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов, факторов роста) в разных экспериментальных культурах клеток в условиях <i>in vitro</i> в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием	128
3.4. Определение уровня относительной экспрессии мРНК генов дифференцировки в разных экспериментальных культурах клеток в условиях <i>in vitro</i> в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием	140
3.5. Анализ суммарной площади очагов минерализации в разных экспериментальных культурах клеток в условиях <i>in vitro</i> в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием	144
3.6. Оценка уровня остеокальцина в супернатантах разных экспериментальных культур клеток в условиях <i>in vitro</i> в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием	146
3.7. Корреляционные взаимосвязи, обнаруженные между исследуемыми показателями	147

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ 150

4.1. Особенности взаимодействия неприлипающих иммунокомпетентных клеток и трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 48 часов	150
---	-----

культивирования	
4.2. Особенности взаимодействия стромальных стволовых клеток с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 14 и 21 суток культивирования	160
4.3. Особенности сокультивирования стромальных стволовых и неприлипающих иммунокомпетентных клеток в присутствии трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 14 и 21 суток культивирования	182
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	198
ВЫВОДЫ	201
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	204

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат.

ГАП – гидроксиапатит.

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

ИК – иммунокомпетентные клетки.

ИФА – иммуноферментный анализ.

кДНК – копияная дезоксирибонуклеиновая кислота.

КМ – костный мозг.

КФ – кальций-фосфатный.

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота.

ППС – полная питательная сред.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

РНК – рибонуклеиновая кислота.

СВФ – стромально-васкулярная фракция.

ССК – стромальные стволовые клетки.

ССК+ИК – смешанная культура стромальных стволовых клеток и иммунокомпетентных клеток крови человека.

ЩФ – щелочная фосфатаза.

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс.

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

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

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

BGLAP – (от англ. *bone gamma-carboxyglutamate protein*) – ген остеокальцина.

BMP – (от англ. *bone morphogenetic proteins*) – костный морфогенетический белок.

BMP2 – (от англ. *bone morphogenetic protein 2*) – Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 - костный морфогенетический белок 2.

BMP6 – (от англ. *bone morphogenetic protein 6*) – костный морфогенетический белок 6.

CaP – (от англ. *calcium phosphate*) – кальций-фосфатный.

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

FGF10 – (от англ. *fibroblast growth factor 10*) – фактор роста фибробластов 10.

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

Gfi1 – (от англ. *growth factor independent 1*) – фактор транскрипции.

hnRNPLL – (от англ. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like*) – гетерогенный ядерный нуклеопротеин.

HPRT1 – (от англ. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) – гипоксантин фосфорибозилтрансфераза 1.

IFN – (от англ. *interferons*) – интерферон.

IL – (от англ. *interleukin*) – интерлейкин.

Jak – тирозинкиназа.

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

OPN – остеопонтин.

PBS – фосфатно-солевой буфер.

PCR – (от англ. *polymerase chain reaction*) – полимеразная цепная реакция.

PTPRC – (от англ. *protein tyrosine-phosphatase, receptor type*) – белок тирозиновая фосфатаза, рецепторный тип.

RANKL – (от англ. *receptor activator of nuclear factor Kappa-Beta*) - лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В.

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

RUNX2 – (от англ. *runt-related transcription factor 2*) – Runt-связанный фактор транскрипции 2.

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

SDF-1 – (от англ. *stromal cell-derived factor-1*) – фактор-1, полученный из стромальных клеток.

SMURF1 – (от англ. *SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1*) – SMAD-специфическая E3-убиквитин-протеинлигаза 1.

TBP – (от англ. *TATA box binding protein*) – ТАТА- связывающий белок.

TBX5 – (от англ. *T-Box Transcription Factor 5*) – фактор транскрипции T-box 5.

TCR – (от англ. *T-cell receptor*) – Т-клеточный рецептор.

Th – (от англ. *helper — помощник*) – Т-хелперы.

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

U2AF26 (U2af114) – (от англ. *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4*) – вспомогательный фактор сплайсинга.

UBC – (от англ. *ubiquitin C*) – убиквитин C.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Костная ткань представляет собой композитную многокомпонентную структурно-функциональную часть опорно-двигательной системы со сложной организацией и играет ключевую роль в образовании скелета и изменении положения тела в пространстве, а также защищает внутренние органы и участвует в регуляции системы кроветворения [Loi F. et al., 2016; Wang W., Yeung K.W.K., 2017; Иванов П.А., 2021].

Как механочувствительный орган, кость играет важную роль в биомеханике, во взаимоотношениях между телом и окружающей средой, а также в коммуникации с нервной системой для установления функционального восприятия и моторного поведения. В последние несколько лет роль костной ткани в гомеостазе на организменном уровне возросла: известно, что помимо обеспечения механической поддержки, защиты тела и выполнения важных функций в кроветворении, она является метаболически активной тканью, постоянно обновляющейся у здоровых людей и участвует в депонировании минеральных веществ, в сохранении кальция, ионном гомеостазе и метаболизме фосфатов [Calvi L.M. et al., 2003; Bergwitz C., Juppner H., 2010]. Кроме того, кость посредством своей эндокринной функции, регулирует энергетический метаболизм, фертильность, по крайней мере у мужчин, и, как было установлено, когнитивные функции [Yadav V.K. et al., 2009; Oury F. et al., 2013], динамически реагируя на внутренние и внешние раздражители [Cappariello A. et al., 2016; Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Ремоделирование кости является непрерывным и пожизненным процессом, и заключается в удалении старой кости путем ее резорбции остеокластами и образовании новой – с участием остеобластов. Эти процессы четко регламентированы в здоровой кости и частично

поддерживаются коммуникацией остеоцитов и механосенсорными процессами.

Согласованное кооперативное взаимодействие различных типов клеток костной ткани, а именно - остеокластов, остеобластов и остеоцитов, играет ключевую роль в регуляции метаболизма костного матрикса и паракринной передаче сигналов, опосредуя ремоделирование кости [Li J. et al., 2018; Bellido T. et al., 2014; Katsimbri P., 2017; Gerosa L., Lombardi G., 2021]. Значительная способность к регенерации кости (физиологической, репаративной, патологической) обусловлена особенностями клеточного состава, в особенности, интеграцией субпопуляций клеток мезенхимного происхождения [Carrariello et al., 2016; Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Стромальные стволовые клетки (ССК) активно взаимодействуют с компонентами врожденной иммунной системы; посредством этих взаимодействий они проявляют как противовоспалительные, так и провоспалительные эффекты, которые играют важную роль в поддержании гомеостатического баланса [Bernardo M. E., Fibbe W.E., 2013; Wu X. et al., 2013; Kovach T.K. et al., 2015; Zhao B., 2017]. ССК являются гипоиimmunогенными или иммунопривилегированными и обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами. Показано влияние ССК на активацию, пролиферативную активность и уровень продукции цитокинов иммунными клетками *in vitro* [Crop M.J. et al., 2010; Baeck C. et al., 2014; Gornostaeva A.N. et al., 2020]. ССК могут регулировать врожденные и адаптивные иммунные реакции в условиях *in vitro* и *in vivo* [Bernardo M. E., Fibbe W.E., 2013]. Иммунокомпетентные клетки (ИК), в частности, Т-лимфоциты, играют важную роль в процессах физиологического и репаративного остеогенеза, завершающегося регенерацией/ремоделированием костной ткани [Kovach T.K. et al., 2015; Tsukasaki M., Takayanagi H., 2019; Khlusov I.A. et al., 2020; Yang N., Liu Y., 2021]. Жизнедеятельность и функциональная активность ССК регулируется

условиями микросреды, что потенцирует модификации цитокинового профиля клетками микроокружения и модулирует специфику функционирования ССК [Wu X. et al., 2013; Zhao B., 2017; Li J. et al., 2018]. Каскады реакций, участвующие в процессе костного ремоделирования, запрограммированы и инициируют иммунный ответ, с помощью активации клеток иммунной системы [Гольдберг и др., 1999; Хаитов Р.М., 2009; Greenblatt M.B., Shim J.H. 2013; Bel S., Hooper L.V., 2015].

Важно отметить, что наряду с химическими и биологическими сигналами (биологически активные медиаторы и фосфаты кальция), физические факторы (в том числе эластичность, твердость, топография поверхности, с которой контактируют клетки), также являются важными регуляторами, оказывающими влияние на клеточную жизнедеятельность [Dalby M.J. et al., 2014; Wang J. et al. 2018].

Степень разработанности темы. Текущая парадигма физиологического ремоделирования кости является неполной [Raggatt L.J., Partridge N.C., 2010]. Несмотря на то, что остеоиммунология успешно развивается, до сих пор остаются неизвестными тонкие механизмы формирования гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в костном мозге и их роль в ремоделировании костной ткани [Zhang H. et al., 2023]. Ниша костного мозга (КМ) включает сложное микроокружение различных типов клеток (кроветворных и некроветворных), а также внеклеточные компоненты (в т.ч. внеклеточный матрикс, химические и физические факторы), которые регулируют баланс между состоянием покоя и активацией ГСК и последующими процессами определения судьбы клеток: пролиферацией, самообновлением и/или дифференцировкой [Morrison S.J., Scadden D.T., 2014; Itkin T. et al., 2016; Li S.-D. et al., 2017].

В целом, *ниши стволовых клеток костного мозга* можно определить как высокоспециализированные и динамичные микроструктуры, которые поддерживают ГСК, а также направляют дифференцировку ССК. Выявление

типа взаимодействий между компонентами ниши имеет решающее значение для определения клеточных и молекулярных сигналов костного ремоделирования [Filipowska J. et al., 2017; Loi F. et al., 2017; Fröbel J. et al., 2021; Sánchez-Lanzas R. et al., 2022].

В настоящей работе мы предприняли попытку исследовать молекулярные и гуморальные сигналы, участвующие в ремоделировании кости, а также роль клеточной кооперации ССК и иммунокомпетентных клеток (как аналог кроветворного компартмента) в этом сложном процессе. Для изучения особенностей клеточной кооперации в условиях физиологической регенерации костной ткани, нами была разработана 3D-модель сокультивирования *in vitro* иммунокомпетентных клеток крови человека и стромальных стволовых клеток жировой ткани в присутствии трехмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием.

Существует тонко регулируемый процесс, который поддерживает равновесие между резорбцией кости и ее образованием, что является фундаментальным для гомеостаза костной ткани, рассматриваемый как ремоделирование кости [Florencio-Silva R. et al., 2015; Katsimbri P., 2017; Wang W., Yeung K.W.K., 2017; Owen R., Reilly G. C., 2018]. Иммунная система играет важную роль в формировании тканей и костной резорбции. Следует отметить, что иммунные клетки и секретируемые ими медиаторы способствуют регуляции костного гомеостаза, тогда как клетки костной ткани, включая остеобласты, остеокласты, остеоциты, также влияют на функциональный статус иммунных клеток [Greenblatt M.B., Shim J.-H., 2013; Harris N., 2015; Yang N., Liu Y., 2021].

Взаимодействие между костным ремоделированием и иммунной системой подтверждается несколькими аргументами. Так, остеокласты происходят из гематопоетических клеток-предшественниц и, следовательно, представляют собой высокоспециализированные иммунные клетки. Кроме того, предшественники как остеокластов, так и остеобластов расположены в

костном мозге, где они находятся в прямом контакте с предшественниками или клетками памяти иммунной системы. Важно отметить, что ключевой про-остеокластогенный цитокин RANKL контролирует не только дифференцировку остеобластов и остеокластов, но и функциональную активность активированных Т-клеток и В-клеток, что также влияет на различные типы иммунных реакций [Tan W. et al., 2011; Wu X. et al., 2013; Meednu N. et al., 2016; Walsh M.C. et al., 2018].

Изучение клеточно-молекулярных процессов ремоделирования кости, с участием иммунокомпетентных клеток проводится, преимущественно, в 2D-клеточной культуре *in vitro* [Kovach T.K. et al., 2015; Humbert P. et al., 2019].

Несмотря на то, что 2D-культивирование клеток очень распространено и применяется более 100 лет [Humbert P. et al., 2019], известно, что клеточные культуры, культивируемые на пластиковых поверхностях, нельзя проецировать на клеточные и тканевые структуры целостного организма, в связи с тем, что двумерная модель культивирования *in vitro* значительно отличается от естественного клеточного микроокружения в условиях *in vivo* и *in situ* [Sung J.H., Shuler M.L., 2009]. Исследование межклеточных взаимодействий в условиях *in vivo* затруднено и растянуто во времени [Коршунов Д.А., Кондакова И.В., 2016; Litvinova L.S. et al., 2018]. При использовании трехмерной (3D) пространственной организации клеточной культуры в условиях культивирования *in vitro*, функционирование клеток значительно приближено к физиологическим параметрам клеточной жизнедеятельности [Коршунов Д.А., Кондакова И.В., 2016; Litvinova L.S. et al., 2018]. Создание искусственных 3D конструкций, которые по своим свойствам приближены к природному ЭЦМ, чрезвычайно затруднено и ограничено особенностями технологического процесса. Одним из эффективных технических решений моделирования физиологического минерального вещества костной ткани представляют собой кальций-фосфатные (КФ) материалы, которые используются в экспериментальных

исследованиях и клинической практике [Шаркеев Ю.П. и др., 2014] и представляют собой простой метод точного повторения комплекса регенеративных процессов *in vivo* [Шаркеев Ю.П. и др., 2014; Rüger B.M. et al., 2018].

Известно модулирующее действие кальций-фосфата на иммунокомпетентные клетки крови и стромальные стволовые клетки [Хлусов И.А. и др., 2010]. Тем не менее, клеточные структуры и функциональные пути реализации эффектов искусственных прототипов естественного межклеточного матрикса остаются на уровне предположений, несмотря на активные попытки изучения тонких механизмов ремоделирования костной ткани [Ratner B.D. et al., 2004].

В настоящей работе мы постарались обобщить роль иммунного микроокружения в регенерации костной ткани, в контексте изучения механизмов продуктивной/эффективной кооперации иммунных клеток, секретируемых ими цитокинов с одной стороны и основных участников регенерации костной ткани - стромальных стволовых клеток, с другой.

В связи с вышесказанным, **целью** настоящего исследования явилось выявление клеточных и молекулярных аспектов, определяющих формирование эффективной кооперации стромальных стволовых и неприлипающих иммунных клеток крови человека на *in vitro* модели регенерации костной ткани.

Задачи исследования:

1. Оценить морфофункциональные реакции монокультур иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток в условиях их дистантного *in vitro* сокультивирования с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием.
2. Определить содержание гуморальных факторов с про- и противовоспалительным, гемопоэтическим действием, секретируемых в

смешанной культуре иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток, во взаимосвязи с изменением экспрессии генов остеодифференцировки в стволовых стромальных клетках и их фенотипического профиля, в условиях 14-дневного дистантного *in vitro* сокультивирования с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием.

3. Провести сравнительный анализ морфофункциональных характеристик смешанной культуры иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток в условиях 2D- и 3D-модели 14- и 21-дневного и культивирования *in vitro*.

4. Выявить в сравнительном аспекте взаимосвязь признаков дифференцировки стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении в состоянии монокультуры и в присутствии иммунокомпетентных клеток, с уровнем остеокальцина в среде культивирования и содержанием клеток с морфологией кроветворных на пластике в условиях 21-дневного дистантного влияния трёхмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием.

5. Выявить клеточные и молекулярные механизмы, определяющие эффективность клеточной кооперации иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток в смешанной культуре, в условиях дистантного 3D-моделирования *in vitro* процессов регенерации системы "кость/костный мозг"

6. Определить общие закономерности и особенности кооперативного взаимодействия иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток в условиях дистантного трехмерного сокультивирования *in vitro*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Трёхмерный матрикс с кальций-фосфатным покрытием при сокультивировании с иммунокомпетентными и стромальными стволовыми клетками в статусе монокультур, является физиологическим раздражителем не антигенной природы, потенцируя усиление продукции клетками молекул

с про- и противовоспалительным, гемопоэтическим действием, повышение экспрессии генов дифференцировки и созревания, что коррелирует с изменением фенотипического профиля иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток.

2. Сокультивирование в условиях 3D-модели в смешанном формате (в течение 14 суток) способствует снижению (в сравнении со смешанной 2D-моделью и 3D-монокультурой иммунокомпетентных клеток) числа $CD3^+$ клеток, несущих на своей поверхности маркеры ранней ($CD25$) и поздней ($CD71$) активации, наивных Т-клеток ($CD3^+CD45RA^+$), при увеличении содержания клеток иммунной памяти ($CD3^+CD45R0^+$), дубль-позитивных форм клеток ($CD3^+CD45RA^+CD45R0^+$) и $CD3^+CD95^+$ лимфоцитов.
3. Дифференцировка стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении, регистрируемая в смешанных культурах, в условиях 14-дневной 3D-модели *in vitro*, наряду с увеличением (в сравнении с 3D-монокультурой) экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL* и *SMURF*), характеризуется ростом числа клеток с фенотипом гемопоэтических $[CD45,34,14,20]^+$, повышением (в сравнении с 3D-монокультурой) концентрации в супернатантах клеточных культур гемопоэтических факторов роста (G-CSF, SCF, LIF, Eotaxin), про- ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10 и IL-13) факторов, хемокина RANTES.
4. Взаимосвязь содержания клеток с морфологией гемопоэтических с повышением уровня остеокальцина в среде культивирования и ростом площади очагов минерализации в 21-дневных смешанных культурах иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток, в условиях непрямого контакта с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием, отражает дифференцировку стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении.

5. Развитие активной кооперации, включающей как гуморальные, так и клеточные взаимодействия, в смешанных *in vitro* культурах иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток человека, в присутствии образцов с кальций-фосфатным покрытием, способствует формированию минерализованного костного матрикса, как тканевого элемента гемопоэзинуцирующего микроокружения, создающего прототип системы "кость/костный мозг".

Научная новизна исследования. Научную ценность представляют данные, свидетельствующие, что трехмерный матрикс с кальций-фосфатным покрытием, при сокультивировании с иммунокомпетентными и стромальными стволовыми клетками в статусе монокультур, является физиологическим раздражителем, способствуя значительному росту секреции клетками молекул с про- и противовоспалительным, гемопоэтическим действием, потенцируя повышение экспрессии генов дифференцировки и созревания, что, в целом, коррелирует с изменением фенотипического профиля иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток. Впервые установлено, что совместное культивирование иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток в условиях дистантной 3D-модели (в течение 14 суток), способствует значительному (по сравнению со смешанной 2D-моделью) снижению числа иммунокомпетентных клеток (CD3⁺), экспрессирующих на своей мембране маркеры ранней (CD25) и поздней (CD71) активации, при увеличении содержания клеток, несущих на поверхности молекулы созревания, дифференцировки (CD45R0⁺) и апоптоза (CD95⁺). Принципиально новыми являются данные о факте дифференцировки наивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD45RA⁺) в Т-клетки иммунной памяти (CD3⁺CD45R0⁺), а также о возможности образования переходных, дубль-позитивных форм клеток (CD3⁺CD45RA⁺CD45R0⁺), регистрируемых в смешанной экспериментальной

3D-модели культивирования (на 14 сутки). Впервые обнаружено, что в 3D-модели дистантного сокультивирования (14-дневное культивирование) стромальных стволовых клеток в формате монокультур, повышение (в сравнении с 2D-моделью) экспрессии генов остеодифференцировки (*RUNX2* и *ALPL*) позитивно коррелирует с ростом числа [CD45,34,14,20]⁺ клеток, на фоне снижения (в сравнении с 2D-монокультурой) содержания про- (IFN γ , TNF α , TRAIL и IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10 и IL-13) молекул и, напротив, увеличения хемокина RANTES в среде культивирования.

Впервые выявлено, что в 14-дневной монокультуре стромальных стволовых клеток, а также в смешанной 3D-модели культивирования, рост содержания секреции клетками гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF и Eotaxin) потенцирует повышение числа [CD45,34,14,20]⁺ клеток, выраженное в большей степени, в смешанной 3D-модели.

Принципиально новыми являются сведения о значительном повышении (в сравнении с 3D-монокультурами) секреции клетками смешанной 3D-культуры молекул с провоспалительным (IFN γ , TNF α и IL-6) и противовоспалительным (IL-4, IL-10 и IL-13) действием и хемокина RANTES при 14-дневном культивировании.

Впервые установлено, что более эффективная дифференцировка (в сравнении с 3D-монокультурой) стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении регистрируется в 3D-модели дистантного сокультивирования (14-дневное) в смешанном формате, что подтверждается достоверным снижением числа [CD73, CD90]⁺ клеток, негативно коррелирующим с ростом экспрессии генов остеодифференцировки - *ALPL* и *SMURF*. Несомненную научную новизну представляют данные о том, что кооперация стромальных стволовых клеток с иммунокомпетентными, в формате смешанной культуры с добавлением трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, способствует достоверному росту уровня остеокальцина в среде культивирования, повышению числа клеток с

морфологией кроветворных и увеличению площади очагов минерализации на пластике около матриксов, что отражает дифференцировку стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении. Научную ценность представляют данные, резюмирующие, что формирование микроокружения костномозговых лакун, посредством ауто- и паракринных механизмов активной гуморальной и межклеточной кооперации иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток человека, потенцирует последние образовывать минерализованный костный матрикс, как тканевый элемент гемопозиндуцирующего микроокружения, что может являться прототипом системы "кость/костный мозг" в условиях *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные знания *фундаментального характера* вскрывают принципиально новые гуморальные и клеточные механизмы физиологической регенерации тканей в трехмерном формате, с уточнением ключевых кооперативных взаимодействий, реализуемых в экспериментальных условиях *in vitro* на межфазных границах между основными участниками - *стромальными стволовыми и иммунокомпетентными клетками*, и прототипом естественного межклеточного вещества костной ткани, матрикса с кальций-фосфатным покрытием. Результаты проведенной работы имеют *фундаментально-прикладную* ценность, которая может быть использована как вектор для последующих разработок в области экспериментального *in vitro* и *in vivo* моделирования процессов регенерации, которые протекают в структуре "кость/костный мозг", в основном, посредством рациональной оптимизации структурно-функционального состояния костномозговой полости костей и понимания ключевых (интегральных) условий кооперативных взаимодействий разных типов клеток.

Практическая значимость настоящего исследования обусловлена потенциальной возможностью развития принципиально новой стратегии тестирования новых материалов и персонализированного выбора имплантатов для индивидуальных решений в сфере технологий прецизионной биоинженерии костной ткани. Вместе с тем, результаты данной работы могут стать методологической основой для развития стратегически обоснованных подходов, обеспечивающих контролируемую дифференцировку и масштабирование остеогенной и кроветворной популяций клеток, для реализации результативных решений в области тканевой биоинженерии, трехмерной физиологии, и регенеративной биомедицины в индивидуальном формате.

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе образовательного научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (ОНК МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта г. Калининград, а также в научно-исследовательской работе лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии ИЭГМ УрО РАН г. Пермь.

Методология и методы диссертационного исследования

Для реализации настоящего исследования в контексте поставленных задач были проведены высокоинформативные и современные методы исследования. Экспериментальные работы были реализованы на базе научного высокотехнологического Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта (г. Калининград). Материалом исследования служили культуры неприлипающих иммунокомпетентных клеток человека, которые были получены из лейковзвеси условно здоровых доноров, и стромальных стволовых клеток (далее ССК), полученных из жировой ткани условно здоровых доноров.

Основные методы исследования:

1. Получение Т-лимфоцитов из лейковзвеси здоровых доноров.
2. Получение стромальных стволовых клеток из жировой ткани условно здоровых доноров.
3. Культуральные методы исследования *in vitro*.
4. Определение уровня относительной экспрессии мРНК генов, ассоциированных дифференцировкой иммунокомпетентных клеток (*U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*), а также с дифференцировкой и созреванием стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении (*BMP2*, *BMP6*, *RUNX2*, *FGF10*, *RUNX2*, *SMURF1*, *TBX5*, *ALP*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
5. Определение фенотипических характеристик культуры Т-лимфоцитов и стромальных стволовых клеток человека с использованием метода проточной цитометрии.
6. Анализ дифференцировки стромальных стволовых клеток и смешанной культуры клеток с использованием метода дифференциального цитологического окрашивания.
7. Определение продукции медиаторов (хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов и факторов роста), в супернатантах клеточных культур иммунокомпетентных клеток, стромальных стволовых клеток и смешанных культур клеток методом проточной флуориметрии.
8. Анализ уровня остеокальцина в супернатантах клеточных культур стромальных стволовых клеток и смешанных культур с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА).
9. Оценка суммарной площади очагов минерализации и определение числа клеток с морфологией кроветворных в культурах стромальных стволовых клеток и смешанных культурах клеток методом компьютерной морфометрии.
10. Статистический анализ полученных результатов.

Степень достоверности результатов

Высокий уровень достоверности экспериментальных данных основан на достаточном объёме материала исследования, применении высокотехнологичных, точных и современных методов исследования (культуральные методы, проточная цитофлуориметрия, проточная флуориметрия, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, оптическая микроскопия, компьютерная морфометрия) и современного приборного комплекса, а также грамотного подбора критериев для статистической обработки полученных экспериментальных данных.

Апробация результатов. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на конференциях и симпозиумах: Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 22 – 25 мая 2017), Всероссийская конференция молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 5 – 8 октября 2017), III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Москва, 15 – 18 ноября 2017), II международная конференция «StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины» (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018), Объединенный иммунологический форум Новосибирск (Новосибирск, 24-28 июня 2019), Третья Международная конференция Future of Biomedicine 2019 (FOB 2019) – Будущее Биомедицины (Остров Русский, Владивосток, 17 – 22 сентября 2019), IV Национальный Конгресс по регенеративной медицине (Москва, 20 - 23 Ноября 2019), International multi-conference on industrial engineering and modern technologies «FarEastCon-2020» (Владивосток, 06 – 09 октября 2020), Международная научная конференция «Высокие технологии и инновации в науке» (Санкт-Петербург 27 сентября 2021), III-й Балтийский симпозиум по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине с международным участием (Калининград, 24-26 ноября 2021), VII Съезд

физиологов СНГ (Сочи, 3-7 октября 2022), Разработка лекарственных средств — традиции и перспективы (Томск, 4 – 6 октября 2023).

Работа осуществлена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№16-15-10031, №18-75-00071), Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ (НШ-2495.2020.7), Государственного задания (№ FZWM-2020-0010), Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (МК-2452.2019.4), Совета по стипендиям Президента Российской Федерации для поддержки молодых ученых и аспирантов (СП-4384.2016.4). Практический аспект работы удостоен премии Калининградской области "Эврика" за разработки в области науки, технологий и инновационной деятельности за работу «Разработка инновационной панели прогностических биомаркеров остеointеграции и регенерации костной ткани при сложных переломах и операциях остеосинтеза».

Публикации. По результатам диссертационной работы изданы 45 научных работ, в том числе 19 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, а также опубликовано 26 статей и тезисов в материалах конференций, съездов, симпозиумов.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 250 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Диссертация содержит 20 рисунков и 20 таблиц. Список использованной литературы включает 406 источников (22 отечественных и 384 иностранных).

Личный вклад автора. Автором лично была разработана научная концепция, сформирован дизайн эксперимента и проведено планирование исследования с постановкой цели и задач для достижения поставленной цели. Автор принимал непосредственное участие в разработке и тестировании экспериментальных моделей, а также в проведении всех этапов

экспериментального исследования. Автором получены, проанализированы и интерпретированы полученные эмпирические данные. В соответствии с полученными результатами исследования были опубликованы статьи в российских и зарубежных изданиях, а также подготовлены тезисы докладов, представленные и освещенные на Всероссийских и международных конференциях. Автором были обобщены результаты настоящего исследования и сформулированы научные выводы.

Автор выражает искреннюю благодарность д.м.н., профессору И.А. Хлусову, профессору кафедры морфологии и общей патологии, руководителю лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, за консультативно-методические консультации, помощь и рекомендации в интерпретации экспериментальных данных; П.А. Иванова, к.м.н., главного врача клиники МЛДЦ «Особый Статус» (ООО ПервыйМед), за помощь в организации получения биообразцов у здоровых доноров для проведения исследований.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I.1. Стромальные стволовые клетки и иммунная регуляция

Стромальные стволовые клетки (ССК) представляют собой гетерогенную популяцию стромальных клеток, которые обладают способностью к самообновлению и потенциалом мультипотентной дифференцировки в различные типы клеток, включая адипоциты, хондроциты и остециты [Barry F. P., Murphy J. M., 2004]. Наличие негематопоэтических стволовых клеток в костном мозге было впервые предложено Конхеймом около 150 лет назад [Cohnheim J., 1867]. В 1968 году Тавассоли и Кросби обнаружили, что трансплантация интактных кусочков костного мозга в экстрамедуллярные участки у грызунов может восстановить как гемопоэтические, так и адвентициальные структуры [Tavassoli M., Crosby W.H., 1968], предоставляя дополнительные доказательства существования негематопоэтических стволовых клеток. Окончательное открытие ССК было сделано в 1970-х годах и принадлежит Фриденштейну А.Я., сообщившему о субпопуляции прилипающих клеток из костного мозга или селезенки, которая сохраняла колониобразующую активность и могла дифференцироваться в остеобласты *in vitro* и *in vivo* после трансплантации [Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S., 1970; Friedenstein A.J. et al., 1974; Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N., 1976]. Термин ССК был введен Арнольдом Капланом, который определил ССК как стромальные клетки, которые «способны дифференцироваться через серию отдельных и уникальных переходных линий в различные фенотипы конечной стадии» [Caplan A.I., 1991]. ССК обладают мультипотентностью, потенциалом к самообновлению и способны мигрировать в ткани. Кроме того, они могут влиять на восстановление тканей *через* паракринные эффекты или прямой межклеточный контакт [Mao F. et al., 2017].

Несмотря на то, что ССК были первоначально выделены из костного мозга, известно, что они существуют в широком спектре тканей взрослого человека, включая мозг, тимус, легкие, печень, селезенку, почки и пульпу зуба [da Silva Meirelles L. et al., 2006; Demircan P.C. et al., 2011; Han Y. et al., 2019; Han Y. et al., 2022].

ССК жировой ткани представляют собой привлекательный вариант для клеточной терапии из-за относительно легкого способа их получения (в сравнении с ССК из других тканевых источников) и способности к экспансии и мультипотентной дифференцировке [da Silva Meirelles L. et al., 2006] (Рисунок 1).

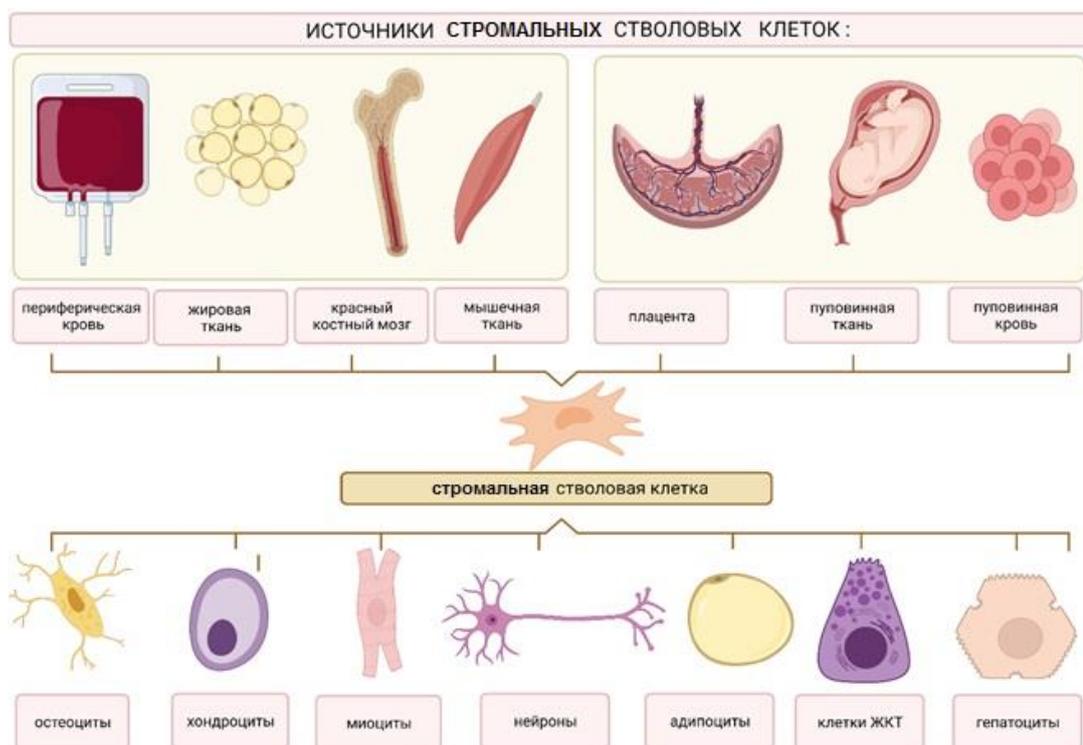


Рисунок 1. Источники стромальных стволовых клеток

Существуют доказательства того, что ССК способны модулировать иммунную систему с помощью различных механизмов, включая продукцию про- и противовоспалительных растворимых факторов.

Изучение механизмов взаимозависимой регуляции между стромальными стволовыми клетками и иммунными клетками открыло эпоху переосмысления регенерации органов и тканей, основанной на привлечении стволовых клеток. Воспринимая сигналы от поврежденной ткани, как эндогенные, так и экзогенные, ССК мигрируют к поврежденному участку, где они участвуют в восстановлении иммунного микроокружения и стимулируют тканевые стволовые клетки/клетки-предшественницы [Сергеев Ю.Д., Базина О.О., 2019] и другие резидентные клетки, тем самым, координируя сложный процесс восстановления органов и тканей [Jimenez-Puerta G.J., 2020].

Наиболее привлекательным свойством ССК при восстановлении/регенерации тканей является иммуносупрессия врожденного и адаптивного иммунитета. В 1998 г. впервые было сообщено о том, что ССК подавляют пролиферацию Т-клеток *in vitro*. В дальнейшем было показано, что ССК могут модулировать активацию и функции различных врожденных и адаптивных иммунных клеток, таких как НК-клетки, нейтрофилы, Т-клетки, В-клетки [Cao W. et al., 2020] (Рисунок 2).

Взаимодействие между ССК и иммунными клетками является сложным. ССК могут регулировать иммунные клетки посредством клеточного контакта, секреции, ингибируя их функциональную активность [Quaedackers M.E. et al., 2009].

Было показано, что аллогенные ССК подавляют пролиферацию Т-лимфоцитов и созревание антигенпрезентирующих клеток [Kovach T.K. et al., 2015]. ССК могут ингибировать иммунные клетки, секретировав цитокины, такие как - трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), фактор роста

гепатоцитов (HGF), простагландин E2 (PGE2), а также другие медиаторы [Li H. et al., 2019].

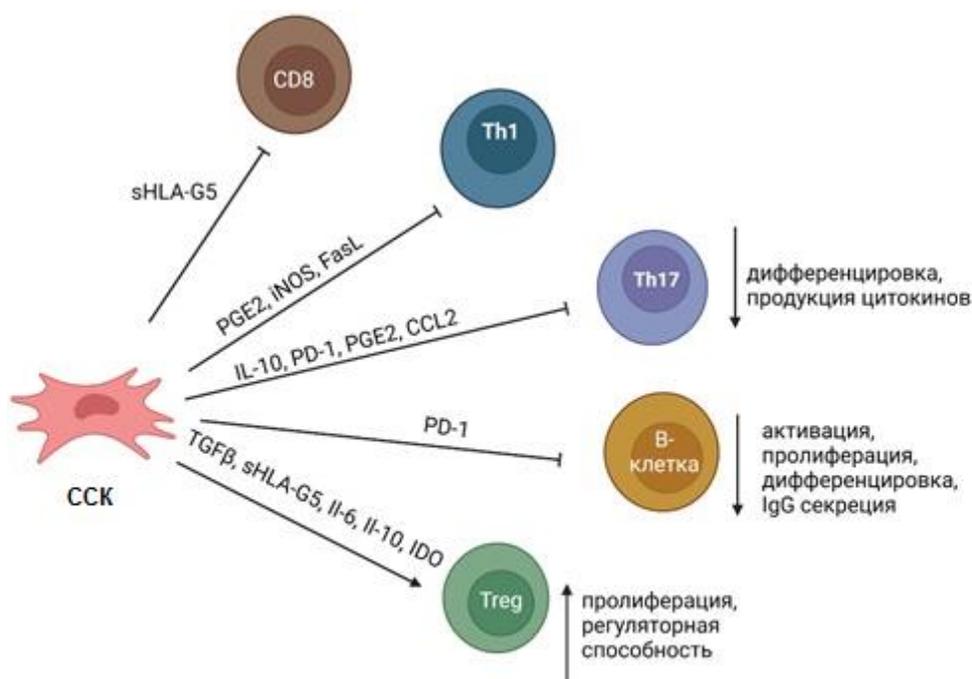


Рисунок 2. Иммунорегуляция адаптивных иммунных клеток, опосредованная стромальными стволовыми клетками [адаптировано из Li H. et al., 2019; Cao W. et al., 2020]

Жизнеспособность и функционирование ССК, как и любых других клеток, зависят от условий микросреды: воспаление, гипоксия, в том числе, изменения цитокинового профиля биологических жидкостей и клеток микроокружения, изменяют биологию ССК. Отмечается, что ССК негативно регулируют активацию и пролиферацию Т-клеток (включая клетки $CD4^+$ и $CD8^+$) посредством секреции провоспалительных растворимых факторов. Известно, что ССК ингибируют пролиферацию, подавляя фазу G0 клеточного цикла Т-лимфоцитов. ССК также могут индуцировать Fas-L-зависимый апоптоз Т-клеток [Li H. et al., 2019; Юрова К.А. и др., 2021].

Эксперименты показали, что более 30 растворимых факторов ССК участвуют на этапах активации и пролиферации Т-лимфоцитов [Anzalone R. et al., 2011], включая HGF, TGF- β , IDO, PGE2 оксид азота (NO) и IL-10. Все продуцируемые ССК факторы обладают иммунорегулирующим действием. Также было обнаружено, что аденозин, продуцируемый ССК, снижает пролиферацию Т-клеток, связываясь с рецепторами аденозина на поверхности лимфоцитов [Li H. et al., 2019]. В связи с вышесказанным, ССК являются продуцентом разнообразных цитокинов и трофических факторов, однако тип и уровень секреции цитокинов варьирует в зависимости от тканевого источника (рисунок 3) [Юрова К.А. и др., 2021].

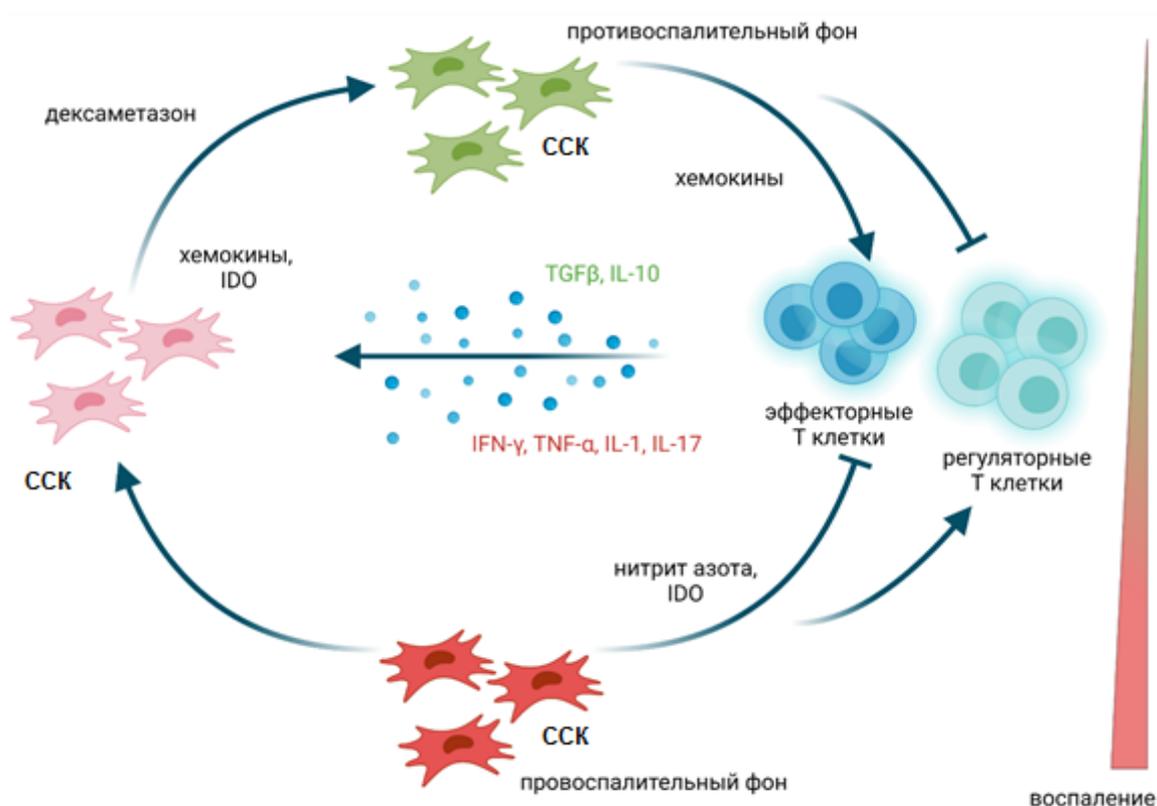


Рисунок 3. Пластичность стромальных стволовых клеток в иммуномодуляции [адаптировано из Cao W. et al., 2015]

Оценка паракринного потенциала ССК из разных тканевых источников очень важна, так как это является одним из определяющих условий (наряду с межклеточными контактами) для выявления их способности взаимодействовать с соседними клетками. Этот факт свидетельствует в пользу того, что специфическое тканевое микроокружение (ниша) ССК контролирует их секреторную активность (рисунок 4) [Liu J. et al., 2022].

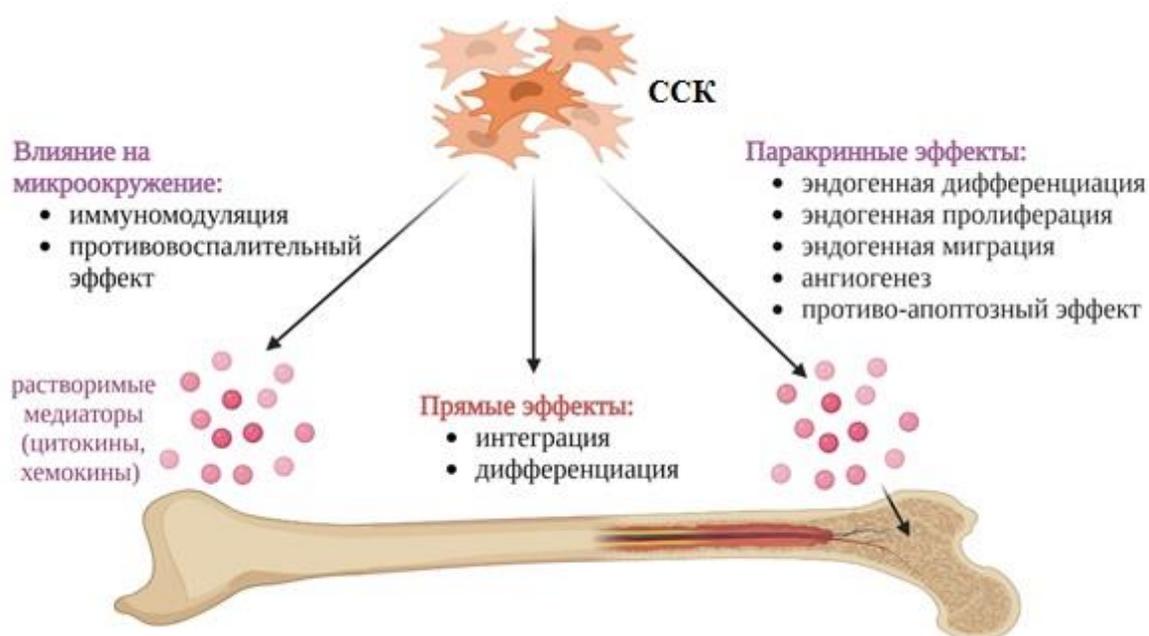


Рисунок 4. Вклад стромальных стволовых клеток в регенерацию при переломах костей [адаптировано из Vicer M. et al., 2021]

В нормальных условиях ССК могут способствовать выживанию Т-лимфоцитов и стимулировать их пролиферацию через интерлейкин-6 (IL-6) зависимые пути [Сгор М.Ж. et al., 2010]. Однако, при активации иммунной системы после повреждения ткани, полученный из Т-клеток интерферон- γ (IFN γ) активирует иммунорегуляторные свойства ССК, что приводит к

подавлению активации и пролиферации иммунных клеток [Li H. et al., 2019].

Эффективная иммуносупрессия ССК может быть вызвана $IFN\gamma$ и сопровождается одновременным присутствием трех других провоспалительных цитокинов: $TNF\alpha$, $IL-1a$ или $IL-1b$ [Норкин И.К. и др., 2021]. Эти комбинации цитокинов стимулируют клетки ССК в отношении продукции некоторых хемокинов и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). Хемокины способствуют миграции Т-клеток к ССК, где оксид азота (NO) ингибирует иммунные ответы Т-клеток [Li H. et al., 2019]. Также было показано, что сочетанное действие $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$, которые продуцируются преимущественно активированными Т-клетками, может индуцировать апоптоз ССК [Reinke S. et al., 2013; Kovach T.K. et al., 2015].

Показано, что ССК могут секретировать факторы, которые стимулируют активность регуляторных Т-клеток (Tregs) [Engela A.U. et al., 2013; Li J. et al., 2018] и, таким образом, передают свои иммуносупрессивные эффекты другим клеткам [Li H. et al., 2019]. Интересно, что ССК может индуцировать Treg из наивных Т-клеток и стимулировать пролиферацию Treg через гемоксигеназу-1 (HO-1) [Baeck C. et al., 2014; Li J. et al., 2018].

ССК экспрессируют $TNF\alpha$ - стимулированный ген / белок 6 (TSG-6), который обеспечивает регуляцию иммунного воспаления. Он противодействует связыванию CXCL8 с гепарином, взаимодействуя с GAG-связывающим сайтом CXCL8, тем самым ингибируя CXCL8-опосредованный хемотаксис нейтрофилов [Dyer D. P. et al., 2014]. TSG-6 может ингибировать экстравазацию лейкоцитов (главным образом нейтрофилов и макрофагов) в месте воспаления. TSG-6 является еще одним ключевым фактором, который играет важную роль в функции восстановления тканей человека, что убедительно продемонстрировано на мышинной модели инфаркта миокарда, перитонита и острого повреждения роговицы и легких [Li H. et al., 2019].

Следовательно, ССК играют центральную роль в поддержании иммунного гомеостаза, путем взаимодействия с цитокинами, хемокинами и мембранными молекулами клеток. ССК обладают значительной иммуномодулирующей активностью и играют роль дирижёра в функционировании как врожденной, так и адаптивной иммунной системы [Li H. et al., 2019].

Секретируемые ССК медиаторы действуют как «переключатели», определяющие их иммунорегуляторные свойства; таргетирование/нацеливание на эти факторы позволяет манипулировать пластичностью иммуномодуляции, опосредованной ССК (рис. 4) [Сао W. et al., 2015]. Как пример, можно рассмотреть репаративную регенерацию костной ткани. Постепенно сложилось понимание, что после травмы костей, для их эффективной репарации, необходимо воспаление, оптимальное по амплитуде и продолжительности. Так, в исследовании мышей с двойным нокаутом гена TNF α (p55-/-/p75-/-) выявили, что для правильного восстановления кости необходимы провоспалительные сигналы, иначе животные не могли инициировать формирование кости и имели заметно сниженную экспрессию мРНК коллагена 1 типа и BGP [Kushioka J. et al., 2023]. Успешная регенерация у млекопитающих требует точной координации множества процессов, которые включают *удаление/клиренс* клеточного дебриса, пролиферацию и активацию клеток-предшественниц, иммунную модуляцию, ангиогенез и иннервацию вновь формирующейся ткани. Иммунные клетки действуют на нескольких этапах процесса регенерации. Их взаимодействие с другими клетками приводит к каскаду событий, которые в дальнейшем определяют судьбу поврежденной ткани. В процессе регенерации участвуют как клеточные, так и гуморальные компоненты иммунной системы [Aurora A.B., Olson E.N., 2014]. Эффективное удаление клеточного дебриса предотвращает персистенцию потенциально токсичного или иммуногенного материала в

тканевой среде, а также активирует фагоциты для секреции иммуномодулирующих факторов, которые выполняют эффекторные функции [Aurora A.V., Olson E.N., 2014].

Таблица 1 – Регенеративная способность, механизмы клиренса, иммунные факторы в норме и при патологии регенерации репрезентативных тканей млекопитающих [адаптировано из Aurora A.V., Olson E.N., 2014]

Ткань	Механизм клиренса дегриса	Пул прогениторных клеток	Факторы	Поляризация и гетерогенность	Неэффективная регенерация	Дефект
Кожа (дерма)	Макрофаги, фибробласты, кератиноциты	Фибробласты, эндотелиальные клетки	TGFβ, EGF, VEGF, IGF	Ранние и поздние макрофаги (аналогичные M1/M2)	Образование полного рубца	Чрезмерное воспаление, снижение миграции, накопление коллагена
Сердце	M1 или Ly-6C ^{hi} моноциты/макрофаги	Резидентные кардиомиоциты	-	Четыре пула сердечных макрофагов	Инфаркт миокарда, сердечная недостаточность	Отсутствие прогениторных клеток, недостаточная поляризация иммунных клеток
Скелетные мышцы	Макрофаги и ФАП	Сателлитные клетки	амфирегулин, IL-6, IL-1β, TNFα, IGF1, TGFβ	Мышечные Treg, M1/M2 макрофаги	Мышечная дистрофия	Дефект миофибрилл, истощение сателлитных клеток, хроническое воспаление
ЦНС (миелинизация)	Макрофаги и клетки микроглии	Клетки-предшественницы олигодендроцитов	IGF1	M1/M2 макрофаги	Рассеянный склероз	Нарушение клиренса миелина
Печень	Клетки Купфера и макрофаги печени	Гепатоциты и прогениторные клетки печени	IL-4; IL-6, TNFα	M1/M2 макрофаги; Th1, Th2, Th17 лимфоциты	Хронические заболевания печени (вирусные, токсические, аутоиммунные, метаболические)	Неразрешенный фиброз
Кости	Остеокласты	Клетки-предшественницы моноцитов	Csf1	-	Остеопороз или остеопетроз	Отсутствие или чрезмерная резорбция кости

Дефекты механизмов клиренса очага повреждения от «мусора»/дебриса могут препятствовать эффективной регенерации органов и тканей [Auroga A.V., Olson E.N., 2014].

I.2. Особенности взаимодействия костной и иммунной систем

Кость и адаптивная иммунная система возникли на одной и той же стадии эволюции позвоночных. Это предполагает, что иммунной системе требовалась кость как часть ее основных элементов в ходе эволюционного процесса [Okamoto K., Takayanagi H., 2019]. Костная и иммунная системы тесно связаны посредством ряда общих регуляторных молекул, включая цитокины, хемокины, рецепторы и факторы транскрипции. Взаимодействуя друг с другом в костном мозге, костные и иммунные клетки совместно регулируют определенные функции костей, такие как каркас тела и рычаги для перемещения тела и его частей в пространстве, контроль минерального обмена и кроветворение [Morrison S.J., Scadden D.T., 2014; Okamoto K., Takayanagi H., 2019].

Тесная взаимосвязь между костью и иммунной системой была обнаружена, начиная с новаторских исследований, показывающих, что факторы, активирующие остеокласты, секретируются иммунными клетками, о которых сообщалось в начале 1970-х годов [Horton J.E. et al., 1972; Mundy G.R. et al., 1974]. В 2000 году термин остеоиммунология был введен в обращение в журнале Nature, чтобы подчеркнуть взаимосвязь между биологией кости и иммунологией [Takayanagi H. et al., 2000]. Последующие исследования у различных генетически модифицированных мышей с ослабленным иммунитетом, дополнительно выявили физиологическое значение механизмов, общих для двух систем. Рецепторный активатор лиганда ядерного фактора (NF) - κ B (RANKL) является одним из наиболее важных цитокинов, объединяющих обе системы. Показано, что RANKL играет множество ролей в развитии иммунной системы, включая образование

лимфатических узлов и дифференцировку эпителиальных клеток тимуса. Взаимодействие между двумя системами было дополнительно подчеркнуто исследованиями случаев ревматоидного артрита (РА), который является одним из наиболее типичных заболеваний скелета, вызванных аномальной активацией иммунной системы [Okamoto K., Takayanagi H., 2019].

Показано, что адаптивная иммунная система играет важную роль в регенерации кости. По сравнению с другими тканями, кость обладает способностью к регенерации без образования рубцовой ткани [Li J. et al., 2018].

Тесная связь между иммунной и скелетной системами обусловлена взаимодействием клеток адаптивного иммунитета и клеток костной ткани, посредством паракринного влияния цитокинов, которые также оказывают действие на ремоделирование кости [Tsukasaki M., Takayanagi H., 2019]. Ремоделирование костной ткани представляет собой тонко регулируемый процесс, характеризующийся сбалансированной активностью остеокластов (клеток, резорбирующих костную ткань) и остеобластов (костеобразующие клетки). Остеобласты, в основном, дифференцируются из предшественников, таких как ССК, тогда как остеокласты происходят из моноцитов, мигрирующих из костного мозга [Li J. et al., 2018]. Остеобласты контролируют ниши гемопоэтических стволовых клеток, обеспечивающих формирование предшественников иммунных клеток [Brunetti G., Grano M., 2021].

El Khassawna et al. [El Khassawna T. et al., 2017] продемонстрировали прямую связь между образованием матрикса и функционированием клеток иммунной системы во время регенерации костной ткани. Авторы показали участие Т-клеток в процессе образования коллагена [Mombaerts P. et al., 1992]. Используя эти модели El. Khassawna et al. (El Khassawna T. et al., 2017) продемонстрировали, что иммунные клетки играют ключевую роль в

модуляции минерализации при эндохондральной оссификации, которая необходима для формирования кости с эластичными свойствами. Образование костной мозоли происходит быстрее при отсутствии Т- и В-клеток, но образовавшаяся костная мозоль имеет низкое качество, и поэтому функциональные В и Т-клетки играют ключевую роль в заживлении кости [Brunetti G., Grano M., 2021]. Это взаимодействие осуществляется посредством биологических медиаторов – цитокинов, которые участвуют в гомеостатической и регенеративной регуляции и связи между иммунной и костно-мышечной системами. Цитокины являются мощными медиаторами, опосредующими функции и дифференцировку остеокластов/остеобластов [Bucher C.H. et al., 2019].

Показано, что иммунные клетки, мигрирующие в поврежденную костную ткань, могут модулировать остеогенную дифференцировку остеопрогениторов. Так, Th1-иммунный ответ, представленный усиленной экспрессией $IFN\gamma$, существенно ингибирует экспрессию генов остеокальцина, Runx2 и щелочной фосфатазы, вследствие чего образование кости замедляется [Kovach T.K. et al., 2015].

Выявлено несколько цитокинов, чья активность, напротив, ингибирует резорбцию и способствует формированию костей: антагонист рецептора IL-1 (IL-1Ra), интерлейкин 4 (IL-4), интерлейкин 10 (IL-10), интерлейкин 13 (IL-13) и трансформирующий фактор роста β (TGF β) [Bucher C.H. et al., 2019]. Т и В-клетки являются соответствующими продуцентами этих провоспалительных цитокинов, а также факторов, влияющих на костный гомеостаз, таких как остеопротегерин (OPG) и RANK-лиганд (RANKL) [Bucher C.H. et al., 2019]. При рассмотрении последовательных событий каскада заживления кости, существенная роль инициатора процесса заживления отведена провоспалительной реакции. Кроме того, последовательная противовоспалительная сигнализация была признана

необходимой для того, чтобы перейти к следующему этапу заживления: реваскуляризации зоны перелома [Schell H. et al., 2017].

Однако иммунные процессы важны не только на ранней стадии заживления. Доказано, что иммунные клетки присутствуют на протяжении всего процесса заживления и наиболее важны во время фазы ремоделирования. Т-клетки тесно связаны с процессом отложения коллагена I типа остеобластами, определяя таким образом структуру новообразованной костной ткани [Bucher C.H. et al., 2019].

Было показано, что специфические субпопуляции Т-клеток по-разному регулируют остеогенную дифференцировку ССК человека *in vitro*. Так, кондиционированная среда, полученная из культуры CD4 + Т-клеток человека (но не из CD8 + Т-клеток), значительно усиливала экспрессию Runx2, остеокальцина и ALPL (alkaline phosphatase), а также увеличивала минерализацию в остеогенных культурах ССК [Li J. et al., 2018].

Данные научной периодики указывают на то, что TNF α ингибирует образование кости путем подавления дифференцировки остеобластов. Таким образом, TNF α способствует разрушению костной ткани за счет увеличения резорбции кости и, ингибирования процессов образования кости. Однако вопрос о влиянии TNF α на дифференцировку ССК в остеобласты остается спорным. Некоторые исследования доказывают, что TNF α ингибирует дифференцировку ССК в остеобласты через WW домен, содержащий E3 ubiquitin protein ligase 1 (Wwp1) или передачу сигналов Notch у мышей. Многие другие исследования, напротив, указывают на то, что TNF α может индуцировать остеогенную дифференцировку ССК, посредством увеличения в них экспрессии мРНК генов Runx2, Osx, остеокальцина (OCN), BMP-2 и щелочной фосфатазы (ALP). Различные роли TNF α в остеогенной дифференцировке ССК, предположительно, связаны с разными стадиями дифференцировки, концентрацией TNF α и временем его воздействия. В условиях TNF α -опосредованного воспаления, продукция ССК TNF α

индуцирует каноническую передачу сигналов Notch и ингибирует их дифференцировку в остеобласты [Zhao B., 2017].

Таким образом, TNF α является ключевым фактором, вызывающим воспаление и воспалительную резорбцию кости. Показано, что воздействие разных доз TNF α в течение разных периодов времени может иметь различные эффекты на активность Notch в ССК. Передача сигналов Notch, в свою очередь, способствует ингибированию дифференцировки ССК в остеобласты и подавляет образование костной ткани [Zhao B., 2017].

Интересно, что Treg клетки могут также способствовать дифференцировке остеобластов из клеток-предшественниц. Например, было продемонстрировано, что Treg способствует регенерации кости с привлечением ССК, путем ингибирования CD4⁺ Т-клеток, которые секретируют IFN γ и TNF α [Li J. et al., 2018], то есть Treg клетки ингибируют процесс TNF α -индуцированного разрушения кости [Li J. et al., 2018].

Таким образом, иммунокомпетентные клетки и продуцируемые ими цитокины имеют важное значение в процессе ремоделирования и регенерации костей. Кроме того, цитокины, совместно с факторами роста, направляют остеопрогениторные ССК по пути остеогенной дифференцировки [Kovach T.K. et al., 2015]. Однако, участие различных иммунокомпетентных клеток и их субпопуляций, а также механизмы, с помощью которых они регулируют тканевую регенерацию и ремоделирование костной ткани, остаются в значительной степени неясными.

1.2.1. Использование ССК для остеорегенерации

ССК являются основным компонентом, применяемым в тканевой инженерии, так как клетки обладают самообновляющимся и мультидифференциальным потенциалом. Одной из клеточных форм ССК являются стромальные стволовые клетки жировой ткани, которые можно дифференцировать в несколько клеточных линий, таких как хондроциты, адипоциты или остеобласты. Благодаря своим особым свойствам ССК часто используются в регенерации костной ткани *in vitro* и *in vivo*. Выявление факторов, участвующих в остеогенной дифференцировке ССК, важно для лучшего понимания механизма остеогенной дифференцировки [Shafaei H., Kalarestaghi H., 2020].

Для стимуляции остеогенеза ССК используются различные методы, включая обычные остеогенные среды, факторы роста, гормоны, гипоксию, механические и химические раздражители, генетическую модификацию и нанотехнологии [Shafaei H., Kalarestaghi H., 2020].

Благодаря более высокой выживаемости клеток, более простой процедуре сбора и более высокой скорости пролиферации ССК могут стать альтернативным источником для регенерации костной ткани [Kim H.J., Park J.-S., 2017].

В 2006 году Международное общество клеточной терапии предложило три основных критерия для определения ССК: (а) адгезия к пластику; (б) экспрессия CD105, CD73 и CD90 $\geq 95\%$ и отрицательная экспрессия CD14, CD19, CD34, CD79 или CD45 $< 2\%$ и HLA класса II; (с) мощная многолинейная дифференциация [Liao H.T., Chen C.T., 2014; Норкин И.К. и др., 2021]. Показано, что ССК обладают свойствами ССК, такими как фибробластоподобная форма, потенциал мультидифференцировки, сильная экспрессия CD105, CD90, CD73 и негативность для CD31, CD45 и HLA класса II [Pham P., 2014].

Основные методы выделения ССК из жировой ткани были адаптированы с использованием жировой ткани животных (мышей и кроликов), а затем этот метод был усовершенствован для использования на людях [Bunnell V.A. et al., 2008]. ССК составляют примерно 1–2% от общего числа клеток в липоаспирате [Zhu Y. et al., 2008]. Обычно при липосакции из 300 мл жировой ткани можно получить 10^7 ССК [Orbay H. et al., 2012]. Стромально-васкулярная фракция (СВФ) представляет собой группы клеток, включающие гемопоэтические клетки-предшественники и стволовые клетки (<0,1%), перициты (3–5%), эндотелиальные клетки (10–20%), гранулоциты (10–15%), лимфоциты (10–15%), моноциты (5–15%) и стромальные клетки (15–30%) [Orbay H. et al., 2012; Shafaei H., Kalarestaghi H., 2020]. Чтобы выделить клетки из жировой ткани, образцы жира измельчают и инкубируют с коллагеназой, а затем центрифугируют [Orbay H. et al., 2012]. После посева клеток ССК прикрепляются к культуральной пластиковой посуде и далее сепарируются естественным образом несколькими пассажами для уменьшения количества гемопоэтических клеток.

Возраст влияет на изоляцию, жизнеспособность, экспансию и генетическую стабильность ССК [Barba M. et al., 2017]. Существует ряд исследований о влиянии возраста на скорость выхода, пролиферацию и остеогенные способности ССК на моделях животных и человека [Zhu M. et al., 2009]. В частности, Beane O.S. с группой исследователей (2014) сравнили ССК, выделенные от молодых кроликов (4–6 месяцев) и старых кроликов (4–5 лет) и обнаружили более высокий выход клеток в молодых группах [Beane O. S. et al., 2014]. Позднее Kawagishi-Hotta M. и соавт. (2017) в исследовании ССК у пациентов в возрасте от 5 до 97 лет обнаружили, что выход клеток, потенциал пролиферации, количество колоний, время удвоения и остеогенная способность ССК не связаны с возрастом пациентов [Kawagishi-Hotta M. et al., 2017]. Zhu M. и др. (2009) сообщили о большей

остеогенной способности ССК у молодых пациентов (20–36 лет), чем у пожилых пациентов (37–46 лет), без существенных различий в скорости пролиферации и времени удвоения популяции [Zhu M. et al., 2009]. Choudhery M. S. с группой исследователей (2014) сообщили об увеличении выхода, пролиферации, экспрессии остеогенных генов (остеокальцина и щелочной фосфатазы) и повышенного остеогенного потенциала ССК в более молодой группе (<30 лет) по сравнению с возрастной группой (>35 лет) [Choudhery M. S. et al., 2014]. Maredziak M. и соавт. (2016) продемонстрировали, что скорость пролиферации, активность супероксиддисмутазы, экспрессия остеопонтина, остеокальцина и костного морфогенного белка-2 (*BMP-2*), а также потенциал дифференцировки ССК были значительно выше у молодых пациентов. (>20 лет) по сравнению со старшими возрастными группами (>50, >60 и >70 лет) [Maredziak M. et al., 2016].

Madonna R. и др. (2011 г.) также отметили, что ССК, выделенные от молодых (40–54 лет), среднего возраста (55–65 лет) и пожилых пациентов (66–92 года), демонстрируют значительное снижение выхода клеток и ангиогенного потенциала у пациентов среднего и старшего возраста по сравнению с более молодыми людьми [Madonna R. et al., 2011]. В целом, эти исследования определяют неблагоприятное влияние старения на функциональные свойства ССК.

I.3. Остеобласты

Остеобласты - специализированные костеобразующие клетки, которые дифференцируются из плюрипотентных мезенхимальных стволовых клеток. Последние могут дифференцироваться в различные клеточные популяции (адипоциты, миоциты, хондроциты и остеобласты), в зависимости от

действующих на них регуляторных факторов транскрипции [Katsimbri P., 2017].

Остеобласты продуцируют вещества органического матрикса кости и содействуют его минерализации [Marie P.J., Kassem M., 2011; Loi F. et al., 2017].

Костные клетки являются компонентами ниши ГСК и участвуют в регуляции иммунных клеток. ССК обеспечивают формирование стромальной опорной ткани. Остеобласты регулируют поддержание ГСК посредством передачи сигналов ангиопоэтина-1. Исследования показали, что при активации с помощью паратиреоидного гормона (ПТГ), субпопуляция остеобластов может увеличивать количество ГСК в костном мозге, за счет продукции гематopoэтических факторов роста, таких как лиганд Notch 1 [Loi F. et al., 2017].

Различные белки и сигнальные пути, в частности, костный морфогенетический белок (BMP) и Wnt-сигнальные пути, важны для регуляции дифференцировки и функции остеобластов. Контролируя экспрессию факторов транскрипции, таких как фактор связывания ядра альфа1 (cbfa1), семейство костных морфогенетических белков кости (BMP), можно регулировать дифференцировку остеобластов [Katsimbri P., 2017].

Канонические пути передачи сигналов Wnt влияют на дифференцировку остеобластов, посредством активации β -катенина, что, в свою очередь, приводит к усилению регуляции факторов транскрипции, которые играют ключевую роль в процессе дифференцировки остеобластов [Zhu B. et al., 2020]. Неканоническая передача сигналов Wnt предотвращает экспрессию специфических рецепторов, необходимых для дифференцировки адипоцитов [Takada I. et al., 2007].

Передача сигналов Wnt также связана с механизмами, которые участвуют в анаболических эффектах паратиреоидного гормона (ПТГ) на формирование костей. Основная функция ПТГ – регуляция уровня кальция в

плазме. Точные механизмы, участвующие в анаболическом воздействии ПТГ на формирование костной ткани, не совсем понятны.

ПТГ предотвращает апоптоз остеобластов и остеоцитов. Кроме того, ингибирование передачи сигналов Wnt с помощью Dickkopf 1 (DKK1) ингибирует Wnt-зависимые эффекты ПТГ [Guo J. et al., 2010]. Каноническая передача сигналов Wnt также стимулирует экспрессию *OPG* и *RANKL* в дифференцированных остеобластах, подавляя образование остеокластов. Наконец, функция остеобластов также регулируется симпатической нервной системой. Остеобласты имеют на своей поверхности β -адренорецепторы, которые при стимуляции ингибируют образование кости и увеличивают ее резорбцию, уменьшая, тем самым, костную массу [Katsimbri P., 2017].

Минерализация достигается за счет местного высвобождения фосфатов из матричных везикул, происходящих из остеобластов, которые находятся внутри остеоида. Вместе с кальцием, из внеклеточной жидкости образуются кристаллы гидроксиапатита. Правильное соотношение органической матрицы и минерала имеет решающее значение для обеспечения правильного баланса между жесткостью и гибкостью скелета [Katsimbri P., 2017].

Как уже упоминалось ранее, остеобласты являются основными компонентами ниш кроветворных стволовых клеток эндоста. Большинство первичных гемопоэтических стволовых клеток распределено вокруг остеобластов. Пространственная близость остеобластов и ГСК предполагает, что они могут быть функционально интерактивными и взаимозависимыми. Хотя эффекты остеобластов на ГСК до конца не исследованы, существуют доказательства участия остеобластов в мобилизации ГСК [Li S.-D. et al., 2017].

Hu K. и Olsen B.R. (2016) было доказано, что VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), паракринно стимулирует перекрестные сигналы между

остеобластами, эндотелиальными и гемопоэтическими клетками, при этом непосредственно влияя на остеобласты через аутокринные механизмы [Hu K., Olsen B.R., 2016].

RANKL - еще один важный фактор, который экспрессируется и продуцируется остеобластами, остеоцитами, Т-лимфоцитами и эндотелиальными клетками в виде растворимого цитокина. RANKL связывается с RANK, экспрессируемым на поверхности преостеокластных клеток, инициируя, тем самым сигнальный каскад, ведущий к их дифференцировке в функциональные остеокласты посредством пути, опосредованного ядерным фактором-каппа В (NFκB) [Kumar G., Roger P.-M., 2019]. У мышей с дефицитом как RANK, так и RANKL наблюдался тяжелый остеопетроз, опосредованный истощением остеокластов [Nakashima T. et al., 2011]. Lo Iacono N. и др. сообщили, что введение RANKL мышам RANKL^{-/-}, которые имеют остеопетротический фенотип и лишены остеокластов, может способствовать восстановлению резорбции кости и уменьшить дефекты скелета [Lo Iacono N. et al., 2012].

Дифференциация остеобластов из ССК - сложный процесс, в котором задействованы различные факторы, и он еще не полностью изучен. Особую роль здесь играет суперсемейство TGF-β, включающее BMP и GDF с многофункциональной активностью [Roelen B.A., Dijke P., 2003; Jäger M. et al., 2004]. В то время как TGF-β способствует ранней хондрогенной и остеобластной дифференцировке за счет увеличения экспрессии мРНК гена *Runx2*, дифференцировка остеобластов ингибируется на поздних стадиях клеточной дифференцировки. Ген *Runx2* (*Cbfa1* / *AML3*) кодирует факторы транскрипции и, как многофункциональный «мастер-ген», регулирует дифференцировку остеобластов [Lian J.B. et al., 2003]. *Runx2* экспрессируется в клетках-предшественницах примерно за 4 дня до появления остеобластов. Белки - Twist 1 и Twist 2 ингибируют ген *Runx2* через специальные домены (так называемые твист боксы) во время развития

скелета, таким образом, являются антагонистами дифференцировки остеобластов. Было показано, что экспрессия типичных для остеобластов белков зависит от снижения активности гена *TWIST* [Bialek P. et al., 2004]. Напротив, *BMP-7* и *-2* увеличивают экспрессию *Cbfa1 / Runx2* и способствуют дифференцировке остеобластов [Gu K. et al., 2004].

Другой группой белков, которые изменяют дифференцировку остеобластов, являются так называемые трансмембранные белки *Notch*. Опосредованное лигандом высвобождение внеклеточных и внутриклеточных субъединиц этих гетеродимерных рецепторных белков играет важную роль в упорядоченной дифференцировке клеток в контексте органогенеза. Кортикостероиды, используемые в контексте дифференцировки остеобластов в культуре клеток, увеличивают экспрессию *Notch1* и *Notch2* [Sciaudone M. et al., 2003; Jäger M. et al., 2004].

Более того, дифференцировка остеобластов контролируется и / или зависит от *BMP-2*-индуцированного эффекта *Osterix* и цитомеханических стимулов [Jäger M. et al., 2004; Kulterer B., 2007].

I.4. Маркеры метаболизма костной ткани

Для оценки уровня метаболизма костной ткани определяют различные маркеры активности костных клеток [Greenblatt M.B. et al., 2017].

Костно-специфическая щелочная фосфатаза

Костно-специфическая щелочная фосфатаза экспрессируется на ранних этапах остеобластогенеза из мезенхимальных предшественников и играет важную роль в деградации природного ингибитора минерализации - пирофосфата. Специфическая для костей изоформа гена *ALPL* усиливает анаболическую активность костей. Щелочная фосфатаза секретируется в

кровоток пропорционально состоянию и уровню дифференцировки остеобластов [Brunetti G., Grano M., 2021].

Остеокальцин

Остеокальцин является наиболее распространенным костно-специфическим белком неколлагенового типа, синтез которого осуществляется на позднем этапе дифференцировки остеобластов [Zoch M.L. et al., 2015]. Присутствие трех остатков γ -карбоксихлутаминовой кислоты, специфичных для активной формы белка остеокальцина, позволяет белку связывать кальций и гидроксиапатит. Остеокальцин прочно связывается с костным минералом гидроксиапатитом, образуя комплекс с коллагеном. Выявлено, что остеокальцин при экзогенном применении в культуре стволовых клеток, усиливает активность щелочной фосфатазы и повышает уровень кальция в среде культивирования [Carvalho M.S. et al., 2019].

Остеокальцин секретируется зрелыми остеобластами. Он работает как гормон костного происхождения, влияя на гомеостаз глюкозы, мужскую фертильность, мышечную активность мышечной и поведенческие реакции, оказывая прямое воздействие на центральную нервную систему. Большая часть остеокальцина, продуцируемого остеобластами, входит в органический матрикс кости, но небольшая его часть попадает в кровоток. Соответственно, остеокальцин считается маркером образования кости, а его концентрация в кровотоке связана с гистоморфометрическими параметрами образования кости [Brunetti G., Grano M., 2021].

Обнаружено, что потеря остеокальцина снижает потенциал самообновления и мультипотентность стволовых клеток, влияет на их дифференцировку в остеогенную линию и ухудшает их ангиогенный потенциал при сохранении хондрогенных и адипогенных линий. Более того, потеря остеокальцина нарушает целостность и созревание внеклеточного

матрикса, что происходит наряду с увеличением содержания гликозаминогликанов, которые связаны с более примитивной скелетной соединительной тканью. Интересно, что остеокальцин, добавленный экзогенно, способен восстановить пролиферативный и остеогенный потенциал ССК, наряду с целостностью матрикса [Carvalho M.S. et al., 2020].

I.5. Процесс физиологического ремоделирования кости

Скелет человека подвергается постоянному ремоделированию – процессу, с помощью которого кости изменяют форму или размер в ответ на физиологические воздействия или механические силы, с которыми сталкивается скелет. Ремоделирование кости помогает сохранять ее прочность и минеральный гомеостаз [Katsimbri P., 2017]. Эта система зависит от динамического баланса между активностью костеобразующих остеобластов и костно-резорбирующих клеток – остеокластов. Процессы костного моделирования и ремоделирования поддерживают сформированную кость в функциональном состоянии [Wang W., Yeung K.W.K., 2017]. Дисбаланс в пользу резорбции кости, опосредованной остеокластами, приводит к деградации кости [Bozec A., Zaiss M.M., 2017].

Биомеханическая стимуляция костей имеет фундаментальное значение для регулирования костного гомеостаза, направляя резидентные клетки на поддержание и восстановление, а также необходима для адаптации всего тела к изменяющейся среде [Gerosa L., Lombardi G., 2021]. Во время репаративной регенерации (так называемое посттравматическое заживление костной ткани) происходит онтологическое повторение процессов эмбрионального развития скелета. Благодаря этому процессу, поврежденная кость полностью восстанавливает свою структуру, функцию и элементный состав [Wang W., Yeung K.W.K., 2017].

Процесс костного моделирования характеризуется модификацией формы, размера и пропорций кости, наблюдается, преимущественно, в период активного роста, и отличается тем, что проходит без предварительной фазы резорбции, в отличие от процесса ремоделирования кости. В зрелом возрасте процесс моделирования позволяет адаптироваться к повышенным нагрузкам [Wang W., Yeung K.W.K., 2017]. Более того, в исследованиях было продемонстрировано, что воздействие циклической растягивающей деформации не только усиливает остеогенную дифференцировку ССК, но также увеличивает экспрессию ангиогенных факторов, то есть механическая нагрузка может одновременно влиять как на ангиогенез, так и на остеогенез [Steward A.J. et al., 2016].

Ремоделирование кости является непрерывным и пожизненным, и заключается в удалении старой кости путем ее резорбции остеокластами [Bellido T., 2014] и замену ее вновь сформированным костным матриксом (остеоидом), который затем подвергается минерализации с образованием новой кости. Процесс ремоделирования начинается внеутробно и продолжается на протяжении всей жизни до смерти, чтобы предотвратить накопление микрповреждений в скелете. Несмотря на то, что ремоделирование происходит на участках, требующих заживления, большинство участков ремоделирования являются случайными. Резорбция кости и формирование кости тесно связаны при ее ремоделировании; дисбаланс этих двух процессов приводит к различным заболеваниям костей, которые обусловлены нарушением минерального обмена: таким как остеопороз (избыточная потеря костной массы) и остеопетроз (избыточное образование костной ткани) [Katsimbri P., 2017].

В кости известны, по меньшей мере, четыре механосенсорных элемента, которые взаимодействуют друг с другом для регуляции моделирования и ремоделирования кости. Эти элементы соответствуют основным типам клеток, резидентам костной ткани: остеоцитам,

остеобластам, остеокластам и клеткам-остеопрогениторам (ССК) [Bozec A., Zaiss M.M., 2017; Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Клетки-остеопрогениторы и преостеобластические клетки, расположенные в костном мозге и надкостнице реагируют на механические стимулы, изменяя в ответ на механическое воздействие пролиферативную активность и способность к дифференцировке, что модулирует остеобластогенез [Gerosa L., Lombardi G., 2021]. Несмотря на то, что остеоциты считаются основными механореактивными элементами в кости, было продемонстрировано, что остеобласты также способны реагировать на механические стимулы [Xiao Z., Quarles L.D., 2015; Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Остеокласты - это многоядерные клетки, образованные путем слияния клеток-предшественниц из линии моноцитов. Остеокласты выполняют специфическую и уникальную функцию резорбции костной ткани [Bozec A., Zaiss M.M., 2017]. Для процесса остеокластогенеза необходимы два основных цитокина: лиганд рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF- κ B (RANKL) и фактор, стимулирующий колонии макрофагов (M-CSF). Эти цитокины продуцируются стромальными клетками костного мозга, остеобластами или фибробластами, а также иммунными клетками, включая Т-клетки [Bozec A., Zaiss M.M., 2017; Gerosa L., Lombardi G., 2021]. Помимо M-CSF и RANKL, другие цитокины, такие как провоспалительный цитокин TNF α , могут влиять на остеокластогенез, что может иметь значение при прогрессировании потери костной массы вследствие воспаления [Weitzmann M.N., 2018].

Таким образом, механостимулы прямо и косвенно регулируют эти клеточные элементы, поскольку каждая популяция клеток может реагировать на механическую стимуляцию путем модуляции путей, которые приводят к совместной регуляции других факторов [Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Внешние стимулы, соответствующие неподвижному или движущемуся в пространстве телу, сходятся в биомеханической стимуляции описанных костных элементов – механосенсоров. Эти механосенсоры, по определению, способны воспринимать биофизические факторы среды и реагировать на них. Скелет должен реконструироваться на протяжении всей жизни, чтобы соответствовать функциональным требованиям (например, изменение интенсивности и / или направление нагрузки) [Gerosa L., Lombardi G., 2021].

В случае, например, хронической интенсивной физической нагрузки кости увеличивают свою прочность и костную массу; напротив, снижение интенсивности нагрузки (например, постельный режим, иммобилизация) соответствует усилению резорбции кости, что приводит к снижению прочности и массы кости и увеличению риска переломов [Okamoto K., Takayanagi H., 2019; Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Важно отметить, что дифференциация и активность остеобластов и остеокластов зависят от состояния иммунной системы организма. Следовательно, происходит сложное перекрестное взаимодействие между костными и иммунными клетками для необходимого и строго регулируемого процесса ремоделирования кости [Kumar G., Roger P.-M., 2019].

Таким образом, ремоделирование кости регулируется механическими стимулами (нагрузкой и упражнениями), а также эндокринными и паракринными сигналами [Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Цикл ремоделирования кости состоит из пяти этапов: активации, резорбции, реверса, формирования и минерализации (рис. 5).

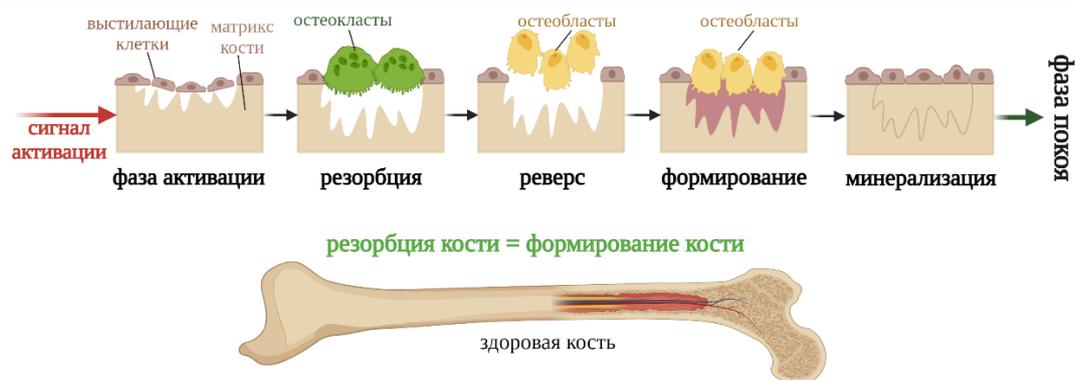


Рисунок 5. Фазы костного ремоделирования [адаптировано из Vicer M. et al., 2021]

Кластеры остеоклотов и остеобластов, которые участвуют в резорбции и формировании кости, в каждой области кости, которая подвергается ремоделированию, расположены во временных анатомических структурах, известных как «основные многоклеточные единицы» (OME). Во время физиологического ремоделирования кости объем кости не изменяется [Andersen T.L. et al., 2009]. Активные OME состоят из резорбирующихся остеокластов, которые покрывают вновь обнаженную поверхность кости, подготавливая ее для отложения замещающей кости. Остеобласты следуют за остеокластами, секретируя и откладывая неминерализованный костный остеоид. Упорядоченное расположение клеток в OME имеет решающее значение для обеспечения правильной последовательности фаз процесса ремоделирования кости [Andersen T.L. et al., 2009].

Фаза активации - первый этап ремоделирования кости. До этого кость находится в состоянии покоя до момента, пока кость не получит сигнал, инициирующий костное ремоделирование. Этот сигнал может быть либо гормональным, опосредованный действием эстрогена или паратиреоидного гормона (ПТГ) на костные клетки, которые реагируют на системные изменения гомеостаза, либо механическим. Физические силы, вызывающие механическое напряжение и микроразрывы скелета, преобразуются в

биологические сигналы, которые также могут быть обнаружены остеоцитами [Bonewald L.F., 2007].

ПТГ, кальцитропный гормон, вырабатывается для поддержания гомеостаза кальция. Он секретируется паращитовидными железами в ответ на снижение уровня кальция в сыворотке крови, действует непосредственно на почки и кости и опосредованно на кишечник. В кости ПТГ связывается с рецептором на поверхности остеобластов и стромальных клеток, для активации экспрессии M-CSF и RANKL, что приводит к дифференцировке и активации остеокластов [Katsimbri P., 2017]. ПТГ также увеличивает абсорбцию кальция почками и стимулирует выработку 1,25-активного витамина D₃ из неактивного предшественника. 1,25-D₃ также косвенно влияет на резорбцию кости. Он увеличивает абсорбцию кальция из кишечника и почек и через ретиноидные рецепторы в остеобластах, а также увеличивает экспрессию RANKL и M-CSF [Crum S.A. et al., 2008].

Эстроген в процессе ремоделирования костей играет роль фактора, сохраняющего костную ткань. Рецепторы эстрогенов экспрессируются как остеокластами, так и остеобластами. Эстроген является критическим гормоном в контроле продолжительности жизни костных клеток, вызывая апоптоз преостеокластов и остеокластов, ингибируя апоптоз остеобластов и остеоцитов и предотвращая чрезмерную резорбцию кости. Образование остеокластов также снижается эстрогеном за счет ингибирования синтеза RANKL остеобластами и остеоцитами. Следовательно, после менопаузы у женщин, при снижении уровня эстрогена, происходит увеличение образования и выживаемости остеокластов, что приводит к усилению резорбции кости (рис. 5) [Crum S.A. et al., 2008].

Резорбция – следующая фаза костного ремоделирования, опосредованная остеокластами. Резорбция кости длится примерно 2–4 недели в течение каждого цикла ремоделирования.

После обнаружения сигнала, клетки выстилки кости втягиваются, эндостальная мембрана переваривается под действием коллагеназы, а предшественники остеокластов привлекаются из кровотока и активируются. Затем остеокласты дифференцируются, а большие многоядерные остеокласты мигрируют и прикрепляются к поверхности кости, инициируя резорбцию для разрушения костного матрикса [Bonewald L.F., 2007].

Остеокласты выделяют ионы водорода, которые снижают pH до 4,5 в костном компартменте, чтобы мобилизовать костный минерал. Они также секретируют другие ферменты, такие как матриксная металлопротеиназа, катепсин К и другие, чтобы переваривать органический костный матрикс. Это приводит к образованию полостей, известных как лакуны Ховшипа на поверхности губчатой кости. Затем многоядерные остеокласты подвергаются апоптозу, завершая фазу резорбции (рис. 5) [Katsimbri P., 2017].

Третья фаза костного ремоделирования – реверс. После стадии резорбции полости кости содержат множество клеток, включая моноциты, остециты и преостеобласты. Они необходимы для формирования костной ткани. Сигналы, связывающие конец резорбции кости с началом образования кости, пока неизвестны. Было предложено множество сигналов связывания, включая ростовые факторы, такие как TGF- β [Katsimbri P., 2017]. Концентрации TGF- β в костном матриксе коррелируют с индексами метаболизма костной ткани, такими как сывороточный остеокальцин и костно-специфическая щелочная фосфатаза, которые являются белками, связанными с остеобластами, или другими побочными продуктами синтеза нового коллагена, такими как пропептиды коллагена I типа. TGF- β ингибирует продукцию RANKL остеобластами, уменьшая активность остеокластов [Bonewald L.F., Johnson M.L., 2008]. Остеокласты заменяются

клетками линии остеобластов, которые инициируют формирование кости (рис. 5).

Четвертая фаза - формирование кости может занять от 4 до 6 месяцев. Остеобласты синтезируют новый белковый матрикс для заполнения пустот, оставленных остеокластами. Этот новый костный матрикс (остеоид) состоит из белков, таких как коллаген I типа. Остеоид составляет около 50% объема кости и 40% массы кости. По мере того, как новый костный матрикс постепенно минерализуется, он образует новую кость. Остеобласты продолжают формировать новую кость, пока не превратятся в покоящиеся выстилающие клетки, которые полностью покрывают вновь образованную поверхность кости. Некоторые остеобласты погружаются во вновь сформированный костный матрикс, становясь остеоцитами с обширной канальцевой сетью, соединяющей их с клетками, выстилающими поверхность кости, остеобластами и другими остеоцитами. После завершения костеобразования, от 50% до 70% остеобластов подвергаются апоптозу, а остальные становятся остеоцитами или клетками, выстилающими кость. Клетки, выстилающие изнутри костную ткань, сохраняют способность к повторной дифференцировке в остеобласты при воздействии специфических стимулов (рис. 5) [Anderson H.C., 2003].

Заключительная фаза - это процесс минерализации (или кальцификации), который начинается примерно через 30 дней после образования остеоида. В губчатой кости этот процесс заканчивается через 90 дней после отложения остеоида, в кортикальной - через 130 дней. После минерализации кость входит в фазу покоя: количество сформированной кости равно количеству резорбированной (рис. 5) [Katsimbri P., 2017].

Ремоделирование кости важно для сохранения механической прочности кости за счет замены старой, поврежденной кости на более новую, более здоровую кость, а также для гомеостаза кальция и фосфатов. Обновление кортикального слоя кости у взрослых людей составляет 2–3% в

год. Этого достаточно для поддержания биомеханической прочности кости. Скорость метаболизма губчатой кости высокая, что указывает на то, что метаболизм губчатой кости более важен для минерального обмена. Когда потребность в кальции или фосфоре увеличивается, может возникнуть потребность в увеличенном количестве единиц ремоделирования кости. Однако эта потребность обычно удовлетворяется за счет повышенной активности существующих остеокластов, и частично, за счет притока и оттока неостеокластического кальция. Новообразованная кость имеет относительно низкое содержание минералов и способна легче обмениваться ионами с внеклеточной жидкостью [Katsimbri P., 2017].

I.6. Роль паракринных медиаторов ССК в ангиогенезе костной ткани

Процессы костеобразования и васкуляризации происходят параллельно и могут протекать по одному из двух путей: эндохондральная оссификация или внутримембранозная оссификация [Ai-Aqi Z.S., et al., 2008]. Эндохондральная оссификация формирует подавляющее большинство костей, включая длинные кости, такие как бедренная и большеберцовая кость. Длинные кости обычно состоят из длинного центрального стержня, известного как диафиз, который покрыт метафизом, содержащим пластинку роста, и дистального эпифиза, который снаружи покрыт суставным хрящом. В плоских костях, таких как кости черепа, образование новой кости включает прямую дифференцировку мезенхимальных клеток в остеобласты в процессе внутримембранозной оссификации [Watson E.C., Adams R.H., 2018].

В отличие от эндохондрального окостенения, внутримембранозное окостенение начинается с конденсации стромальных стволовых клеток с образованием губчатой структуры. Эти клетки секретируют такие факторы, как VEGF-A и внеклеточный матрикс (ЭЦМ), которые способствуют дифференцировке стромальных стволовых клеток в остеопрогениторы и

остеобласты с образованием центров окостенения и формированием сосудистой сети вокруг них, что способствует окостенению [Percival C.J., Richtsmeier J.T., 2013]. Было показано, что потеря экспрессии VEGF-A в остеопрогениторах препятствует их дифференцировке в зрелые костеобразующие остеобласты, что приводит к снижению плотности костей [Liu Y. et al., 2012].

Воздействие провоспалительных медиаторов на ССК вызывает динамическое увеличение продукции проангиогенных факторов одновременно с генерацией клеток, участвующих в неоваскуляризации [Rüger V.M. et al., 2018].

Сосудистая сеть кости формируется в результате ангиогенеза [Bodnar R.J. et al., 2006]. Ангиогенез - сложный физиологический процесс, который обеспечивает рост и развитие кровеносной системы. Подобно развитию, формирование и восстановление кости после травмы может происходить либо через эндохондральную оссификацию, либо через внутримембранозную оссификацию. В то время как нестабильные гипоксические переломы обычно восстанавливаются за счет эндохондральной оссификации [Dirckx N. et al., 2013], стабильные переломы костей, как правило, имеют достаточный доступ к кислороду, питательным веществам и трофическим факторам, чтобы инициировать прямую дифференцировку стромальных стволовых клеток в остеобласты, как это происходит при внутримембранозной оссификации [Ucuzian A.A., Greisler H.P., 2007; Watson E.C., Adams R.H., 2018; Ratushnyy A. et al., 2020]. В случае эндохондральной оссификации, высокий уровень VEGF-A в гематоме способствуют инвазии сосудов, что способствует образованию мягкой костной мозоли [Chung A.S., Ferrara N., 2011]. Мягкая мозоль содержит остеобласты, способствующие формированию костной ткани, а также хондроциты, которые способствуют образованию нового хряща. Затем она превращается в твердую мозоль, а далее - трансформируется в зрелую кость. Кровоснабжение важно для образования

костной мозоли во время заживления и восстановления переломов [Maes C. et al., 2008; Bishop J.A. et al., 2012; Gomez-Barrena E. et al., 2015], однако около 10% всех пациентов с переломами костей демонстрируют нарушение заживления переломов из-за отсутствия кровоснабжения после травмы [Wang Y. et al., 2007; Nakai T. et al., 2009; Thi M.M. et al., 2010; Tzeng H.E. et al., 2013; Gomez-Barrena E. et al., 2015]. Если кровоток нарушен, это может замедлить заживление и восстановление костей [Wan C. et al., 2008]. Было показано, что фармакологическое ингибирование ангиогенеза предотвращает образование костной мозоли при заживлении переломов и вызывает образование фиброзной ткани [Hausman M.R. et al., 2001]. Кровеносные сосуды необходимы не только для снабжения образующейся ткани кислородом и питательными веществами во время восстановления костей. Инвазия сосудов также важна для облегчения проникновения предшественников остеобластов в костную мозоль перелома [Maes C. et al., 2010]. Также известно, что костная сосудистая сеть напрямую влияет на структуру отложения минерализованного костного матрикса, действуя как направляющий шаблон [Ben Shoham A. et al., 2016].

На баланс остеогенеза и ангиогенеза напрямую влияет перекрестная связь между конкретными популяциями ГСК, остеобластами, эндотелиальными клетками и хондроцитами [Clarkin C.E., Gerstenfeld L.C., 2013]. Этот перекрестный обмен зависит от нескольких путей передачи сигналов, включая передачу сигналов VEGF, HIF, Notch, BMP и FGF [Duan X. et al., 2015; Hu K., Olsen B.R. 2016], а также строго регулируемого взаимодействия между эндотелиальными клетками с клетками периваскулярного микроокружения, поддерживаемого механо-физическими и химическими сигналами внеклеточного матрикса [Rüger B.M. et al., 2018].

Формирование новых сосудов осуществляется, главным образом, за счет ангиогенеза, которому способствует процесс, называемый постнатальным васкулогенезом, когда клетки-предшественники из костного

мозга мобилизуются в кровоток, где находятся участки активного ангиогенеза и происходит их дифференцировка в зрелые эндотелиальные клетки. Выход фибриногена в периваскулярное пространство во время воспалительных процессов создает микросреду, подходящую для этих типов клеток, что помогает им взаимодействовать друг с другом прямо или опосредованно через продукцию паракринных факторов [Davalos D., Akassoglou K., 2012]. Цитокины действуют согласованно в сложных сетях, где проангиогенные факторы усиливают процесс воспаления. Дополнительную сложность добавляют плеiotропные эффекты и избыточность большинства цитокинов, участвующих в неоваскуляризации и воспалении. IL-6 обладает как провоспалительными, так и противовоспалительными свойствами и может косвенно вызывать повышение сосудистой проницаемости и запустить процесс образования новых сосудов, инициируя продукцию VEGF [Tzeng H.-E. et al., 2013]. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) может потенцировать постнатальную неоваскуляризацию [Davalos D., Akassoglou K., 2012].

Известно, что регенерация поврежденных тканей инициируется воспалительной реакцией, которая, в конечном итоге, подавляется, и связана с физиологической неоваскуляризацией, необходимой для восстановления функции ткани. Однако если этот процесс не организован должным образом, он приводит к постоянному циклу воспаления и повторяющемуся повреждению тканей, с сопутствующим чрезмерным образованием новых сосудов. Перекрестная связь между воспалением и неоваскуляризацией происходит в конкретном периваскулярном микроокружении, где ключевые участники каскада свертывания, такие как фибриноген / фибрин, в сочетании со сложной сетью химических сигналов и клеточных взаимодействий, инициируют и поддерживают эти процессы [Rüger B.M. et al., 2018].

Кровеносные сосуды участвуют в процессе развития и ремоделирования костей, а также регулируют регенерацию скелета,

доставляя питательные вещества, кислород, гормоны или факторы роста к клеткам костной ткани. Кровеносные сосуды, расположенные в полости костного мозга длинных трубчатых костей, также координируют процесс кроветворения и снабжают ниши предшественницами клеток крови.

Важно отметить, что помимо продукции различных сигнальных факторов, например, VEGF-A, кровеносные сосуды, локализованные в полости костного мозга, организуют процесс кроветворения и обеспечивают присутствие гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в необходимой нише [Filipowska J. et al., 2017].

Правильная васкуляризация не только необходима для образования или ремоделирования кости, но и является ключевым фактором в разработке стратегий регенерации кости *in-* и *ex vivo*, например, на основе тканевой инженерии [Filipowska J. et al., 2017].

I.7. Гемопоэтические стволовые клетки

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) дают начало всем клеткам крови. Активность ГСК регулируется как внутренними, так и внешними сигналами, последние из которых происходят от клеток ниши. Было показано, что различные типы клеток, находящиеся в костном мозге, включая стромальные клетки-предшественники, костные клетки, эндотелиальные и нервные клетки, регулируют активность ГСК в костном мозге [Morrison S.J., Scadden D.T., 2014]. Однако механизмы, лежащие в основе того, как молекулярный и клеточный состав ниши поддерживает активность ГСК, сложны и до конца не изучены. Понимание роли костных клеток в регуляции не только ГСК, но и их потомков, таких как иммунные клетки-предшественники в микроокружении костного мозга, стало одной из важнейших тем в остеоиммунологии [Danks L., Takayanagi H., 2013].

Остеобласты образуют новую кость, обеспечивая структурную платформу для поддержания ГСК в костном мозге. В 2003 году две независимые группы сообщили, что остеобласты отвечают за регуляцию ГСК *in vivo*, продемонстрировав, что количество остеобластов было связано с количеством ГСК. Эти новаторские исследования подчеркнули важность присутствия остеобластов в нише ГСК. Более поздние исследования доказали, что делеция остеобластов снижает популяцию ГСК. Также было показано, что предшественники скелета плода обладают способностью восстанавливать эктопическую нишу ГСК, что дополнительно указывает на корреляцию между остеобластами и ГСК в костном мозге [Okamoto K., Takayanagi H., 2019].

Известно, что ГСК, лишенные рецептора, чувствительного к кальцию, не могут оседать в эндостальных участках рядом с резорбирующими остеокластами. Этот факт указывает на то, что высокая концентрация Ca^{2+} , которая отмечается в результате резорбции кости, участвует в поддержании ГСК. Таким образом, образование нишевого пространства за счет резорбции остеокластической кости, может способствовать нормальному кроветворению. ГСК сохраняются в костном мозге благодаря экспрессии CXCR4, который является рецептором для CXCL12 на клетках ниши. Остеокласты влияют на взаимодействие между ГСК и нишевыми клетками, секретируя MMP9, который разрушает CXCL12. Следовательно, мобилизация ГСК из костного мозга может быть вызвана активацией остеокластов [Okamoto K., Takayanagi H., 2019].

Несмотря на то, что в настоящее время принято считать, что ГСК локализируются вблизи кровеносных сосудов костей (как артерий, так и вен), конкретная локализация их ниши до сих пор неизвестна [Filipowska J. et al., 2017]. Однако недавние исследования Acar M. et al. [Acar M. et al., 2015], посвященные анализу локализации ниши ГСК мыши в костном мозге длинных костей (голени и бедра), позволили обнаружить, что примерно 85%

клеток расположены в пределах 10–30 мкм от синусоидального кровеносного сосуда. Большинство ГСК локализуются в перисинусоидальных нишах по всему костному мозгу и не располагаются рядом с артериолами, сосудами переходной зоны или поверхностями костей. С другой стороны, Kunisaki Y. et al. [Kunisaki Y. et al., 2013] продемонстрировали, что покоящиеся ГСК специфически связываются с небольшими артериолами, которые очень часто распределяются в эндостальном костном мозге. Itkin T. и et al. [Itkin T. et al., 2016] обнаружили, что разные типы кровеносных сосудов с различными свойствами проницаемости, регулируют поддержание стволовых клеток костного мозга млекопитающих и перенос лейкоцитов. Артериальные кровеносные сосуды с более низкой проницаемостью (содержащие Sca-1-, VE-кадгерин- и нестин-положительные клетки) поддерживают ГСК в неактивном состоянии, тогда как синусоиды с более высокой проницаемостью (VE-cadherin-positive), способствуют активации ГСК и клеток-предшественников (рисунок 6).

Эти результаты, в целом, предполагают, что артериолярные ниши ответственны за поддержание покоя ГСК. Постоянный обмен между двумя нишами обеспечивает баланс пролиферации и покоя ГСК, который при нарушении может привести к развитию лейкемии [Filipowska J. et al., 2017].

Ранее предполагалось, что под воздействием стресса, RANKL-активированные остеокласты способствуют миграции ГСК из костного мозга [Kollet O. et al., 2006]. Однако другое исследование продемонстрировало, что остеокласты не являются необходимыми для миграции ГСК [Loi F. et al., 2016].

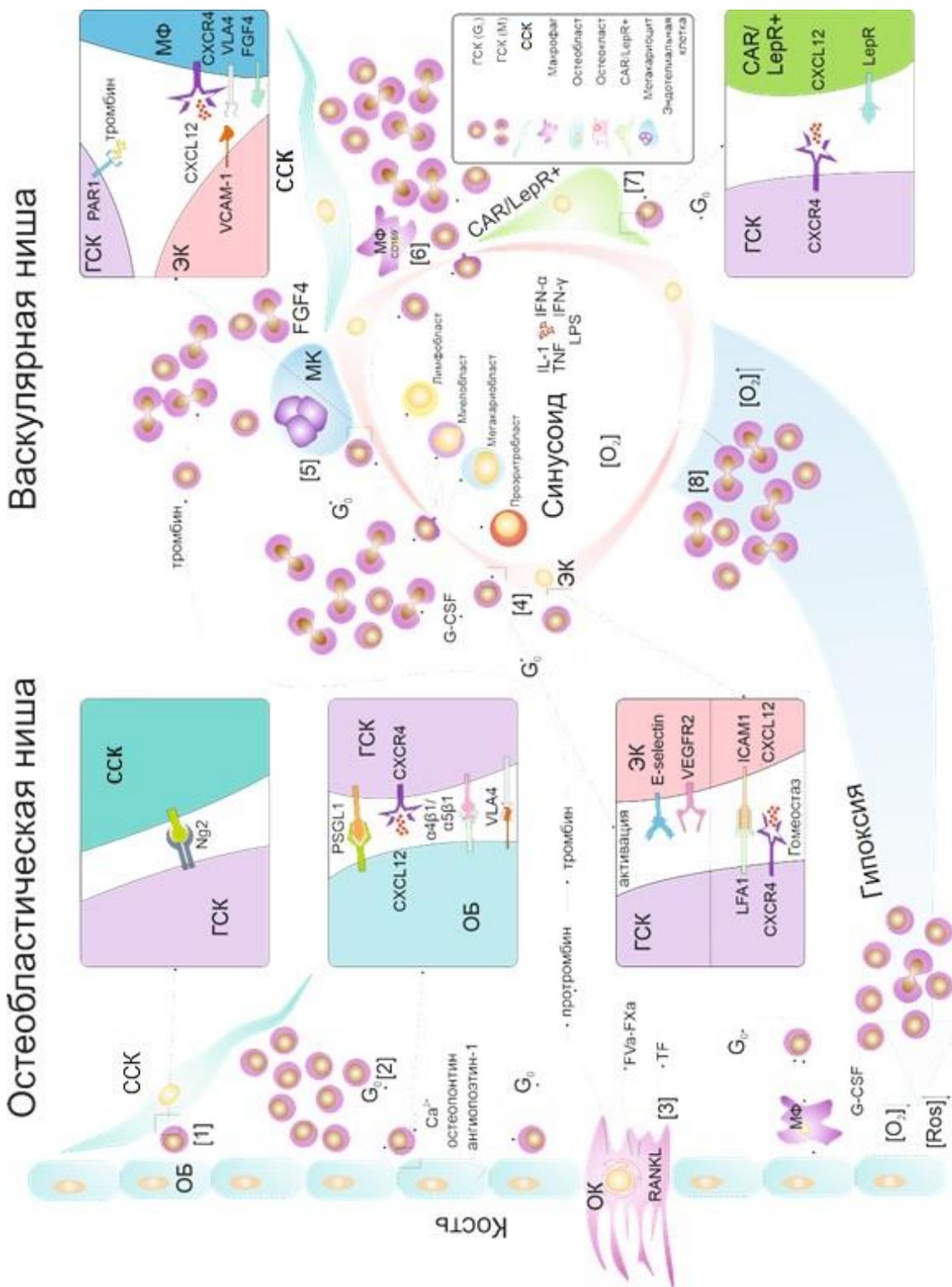


Рисунок 6. Клеточные и молекулярные основы остеобластических и сосудистых ниш в процессах кроветворения и ремоделирования кости [адаптировано из Yurova K.A. et al., 2019]

Важно отметить, что в регуляции дифференцировки определенных иммунных клеток, включая лимфоидные, ключевая роль принадлежит клеткам линии остеобластов [Okamoto K., Takayanagi H., 2019].

I.8. Роль экстрацеллюлярного матрикса в жизнедеятельности клеток

Экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ) является основным компонентом микроокружения клеток [Kisiday J. et al., 2002]. Во взрослом организме ГСК преимущественно обнаруживаются в микроокружении КМ. В конце 1970-х годов британский гематолог Schofield R. первым предложил концепцию, согласно которой ГСК не распределяются случайным образом в микроокружении КМ, а локализуются в определенных областях — нишах ГСК [Schofield R., 1978]. Двадцать пять лет спустя были получены первые экспериментальные доказательства существования остеобластической ниши в эндосте [Calvi L.M. et al., 2003; Zhang J. et al., 2003]. Два года спустя было обнаружено существование сосудистой ниши [Kiel M.J. et al., 2005], и с этого времени проводились интенсивные исследования, а иногда и противоречивые дискуссии о том, какое микроокружение является наиболее влиятельным для ГСК [Kiel M.J., Morrison S.J., 2008; Nakamura-Ishizu A., Suda T., 2019; Kokkaliaris K.D. et al., 2020]. Сегодня большинство исследователей согласны с тем, что ниши ГСК являются перисинусоидальными (около синусоидов) [Comazzetto S. et al., 2021]. Ниши контролируют самообновление, пролиферацию и дифференцировку, а также транспортировку ГСК и могут рассматриваться как сеть, которая состоит из негематопоетических или дифференцированных типов клеток гемопоэтических ниш, мембраносвязанных или секретируемых сигнальных молекул семейств цитокинов или хемокинов и комплекса ЭЦМ [Wilson A., Trumpp A., 2006]. ЭЦМ может предоставлять биофизическую и сигнальную информацию, а функции ЭЦМ включают в себя регуляцию клеточной

адгезии и миграции, контроль пролиферации и дифференцировки, а также определение формы клеток – все это важные вопросы в нишах стволовых клеток [Lee-Thedieck C. et al., 2021].

Разнообразие нишевых клеток варьируется от стромальных стволовых клеток до зрелых гемопоэтических клеток, что приводит к парадоксальной ситуации, когда почти все клеточные компоненты в микроокружении КМ могут иметь более или менее важную функцию контроля ГСК [Pinho S., Frenette P.S., 2019]. Клетки, идентифицированные как клетки-кандидаты ниши, в основном включают эндотелиальные клетки синусоидов и артериол [Perlin J.R. et al., 2017; Prendergast Á.M. et al., 2017; Xu C. et al., 2018; Tikhonova A.N. et al., 2019] и периваскулярные клетки [Greenbaum A. et al., 2013; Comazzetto S. et al., 2019]. Другими клетками в микроокружении КМ, которые, как сообщается, связаны с ГСК, являются клетки остеолинейного происхождения, такие как стромальные стволовые клетки КМ (ССК; включая скелетные стволовые клетки), остеобласты и даже остециты [Asada N. et al., 2013; Bowers M. et al., 2015,], адипоциты [Zhou B.O. et al., 2017], клетки гематопоэтического происхождения, такие как мегакариоциты [Nakamura-Ishizu A. et al., 2015] и остеокласты [Chow A. Et al., 2013] и нейрональные клетки, такие как немиелинизированные шванновские клетки [Zhou B.O. et al., 2017; Maryanovich M. et al., 2018]. При наличии множества сообщений о различных клетках ниши КМ, иногда противоречивые результаты могут быть объяснены использованием различных методов, изучением трансплантированных и гомеостатических ГСК в КМ или анализом различных костных тканей, таких как большеберцовая кость, бедренная кость, грудина или свод черепа [Kokkaliaris K.D., 2020].

Многочисленные нишевые клетки КМ могут продуцировать и секретировать ключевые регуляторы ГСК, такие как SDF-1 (фактор 1, полученный из стромальных клеток, также известный как CXCL-12),

ангиопоэтин 1 или фактор стволовых клеток (SCF) [Mendelson A., Frenette P.S., 2014], но относительный вклад различных популяций клеток ниши как важного источника этих цитокинов, до сих пор до конца не понятен, поскольку экспрессия различных факторов не ограничивается отдельными типами клеток ниши. Помимо этих цитокинов, различные ниши клеток КМ также продуцируют компоненты ЭЦМ, которые создают матрицы различной жесткости в микроокружении костного мозга. Остеобласты участвуют в формировании кости – ткани очень высокой жесткости [Florencio-Silva R. et al., 2015]. Различные типы ССК могут синтезировать очень мягкий интерстициальный матрикс, который можно обнаружить как специализированные ретикулярные волокна между синусоидальной сетью [Susek K.H. et al., 2018]. А эндотелиальные клетки, адипоциты и нейрональные клетки могут синтезировать базальные мембраны, структурированный матрикс промежуточной жесткости [Candiello J. et al., 2007]. Поскольку ГСК и их более дифференцированные предшественники могут воспринимать биомеханические сигналы [Lee-Thedieck C., Spatz J.P., 2014], пространственная локализация этих клеток наряду с их внедрением в мягкий или жесткий матрикс, безусловно, может влиять на их судьбу.

ЭЦМ в костном мозге также состоит из различных гликопротеинов - гликозилированных многофункциональных белков, которые выполняют широкий спектр функций в костном мозге. Основными гликопротеинами, играющими важную роль в нише ГСК костного мозга являются: ламинины, нетрины, нидогены, фибронектины, тенасцины, фибулины, фибриллины, тромбоспондины, остеопонтин, остеонектин, периостин, дермапонтин [Lee-Thedieck C. et al., 2021].

У млекопитающих коллагены составляют примерно 30% от общей массы всех белков и, таким образом, являются наиболее широко экспрессируемым классом белков. В зависимости от структуры и строения белковой молекулы коллагены можно подразделить на коллагены,

образующие фибриллы (коллаген типа I, II, III, V, XI, XXIV и XXVII), коллагены, ассоциированные с фибриллами, с прерывистыми тройными спиралями (FACIT; коллаген типа IX, XII, XIV, XVI и с XIX по XXII), сетеобразующие коллагены (коллагены типов IV, VIII и X), мембраносвязанные коллагены (коллагены типов XIII, XVII, XXIII, XXV), мультиплексины (коллагены типа XV и XVIII) и другие коллагены (коллаген типов VI, VII, XXVI и XXVIII) [Ricard-Blum S., 2011]. Было описано, что члены каждой из этих подгрупп, за исключением мембраносвязанных коллагенов, экспрессируются в КМ и играют важную роль в различных гематопозитических процессах.

Коллагены выполняют структурные и механические функции. Они способствуют клеточной организации, а также формированию тканей и сохранению их целостности [Ricard-Blum S., 2011]. Клетки могут взаимодействовать с коллагенами через специфические рецепторы, и, таким образом, коллагены также участвуют в регуляции клеточной адгезии, миграции, пролиферации или дифференцировке. Коллаген I типа является наиболее распространенным белком в костях и связывает кальций-чувствительные рецепторы, экспрессируемые на ГСК во время удержания в эндостальной области костного мозга у мышей. Фибробласты и стромальные клетки секретируют коллаген III, содержание которого повышено в сыворотке крови пациентов с хроническим миелофиброзом. Обильный микрофибриллярный коллаген VI, секретируемый макрофагами, обладает сильными цитoadгезивными свойствами и опосредует тесные межклеточные взаимодействия, обеспечивая биомеханическую поддержку клеток [Saw S. et al., 2019].

Протеогликаны являются третьим основным компонентом ЭЦМ, влияющим на поведение ГСК в их нишах. Высокоорганизованное взаимодействие различных клеток и молекул ЭЦМ в нишах ГСК имеет решающее значение. При анализе изменяющегося микроокружения во время

развития ГСК большинство исследований фокусировались на различном составе клеток и растворимых факторах [Mirshekar-Syahkal V. et al., 2014; Mahony C.V., Bertrand J.Y., 2019]. Однако стоит также учитывать биофизические параметры, влияющие на ГСК. Не так давно стало очевидно, что ГСК чувствительны к физическим сигналам в окружающей среде, таким как эластичность субстрата [Holst J. et al., 2010]. С тех пор сообщалось, что ГСК реагируют на многие биофизические параметры, включая нанотопографию (например, [Chua K.-N. Et al., 2006], гидростатическое давление (например, [Kang Y.G. et al., 2018]), механическую нагрузку под действием микрогравитации (например, [Blaber E.A. et al., 2014]) и механические свойства окружающей среды (например, [Choi J.S., Harley V.A.C., 2012]), а также топографию поверхности (в т.ч. геометрия, размер, форма). Все это сильно влияет на клеточную адгезию, миграцию, а также функциональное состояние клеток и их дифференцировку [Lee-Thedieck C. et al., 2012; Song X. et al. 2018; Wang J. et al. 2018; Ozdemir T. et al., 2019].

Так, более жесткая эндостальная ниша поддерживает покоящиеся ГСК, тогда как сравнительно более мягкая сосудистая ниша - сохраняет активные ГСК [Jansen L.E. et al., 2015]. Проведенные исследования показали, что, комбинируя коллаген с гликопротеинами матрикса, специфичными для ниши КМ (с фибронектином, моделирующим жесткую эндостальную область, и ламинином, имитирующим мягкие области около сосудистой сети), жесткая матрица способствовала пролиферации популяций ранних миелоидных предшественников, тогда как мягкая матрица усиливала дифференцировку эритроидных клеток *in vitro* [Choi J.S., Harley V.A., 2017; Saw S. et al., 2019].

Жесткость матрикса и результирующее клеточное напряжение оказались критическими для судьбы и пролиферации стромальных стволовых клеток [Brunner M. et al., 2018]. Эти механические и связанные с матрицей сигналы, вероятно, очень важны для контроля сцепления остеобластов/остеокластов. Во время развития кости преостеобласты

располагаются как в соединительной ткани (надкостнице), так и на минерализованных поверхностях, в то время как дифференцированные остеобласты обнаруживаются исключительно в тесном контакте с минерализованным костным матриксом. Эти данные подтверждают точку зрения, что жесткость матрикса может обеспечивать сигнал, необходимый для перехода преостеобластов в остеобласты [Brunner M. et al., 2018].

Было показано, что распознавание механических раздражителей происходит через уникальный механизм, называемый механотрансдукцией [Saidova A., Vorobjev I.A., 2020]. Механотрансдукция внеклеточного матрикса осуществляется через молекулярную муфту, которая устанавливает баланс между внеклеточной механической стабильностью и внутриклеточной сократимостью. Системы цитоскелета являются основными механосенсорами и механотрансмиттерами (актиновые волокна, микротрубочки) этой системы [Bershadsky A.D. et al., 2003; Roostalu J., Surrey T., 2017; Zwetsloot A.J. et al., 2018].

McBeath R. et al. (2004) убедительно доказали, что форма клетки определяется как внутренней конфигурацией цитоскелета, так и внешними взаимодействиями с внеклеточным матриксом и соседними клетками. Было показано, что форма клетки является ключевым регулятором дифференцировки ССК [McBeath R. et al., 2004]. Так, было выявлено, что на небольших островках, где ССК приняли округлую морфологию, преобладал адипогенез, в то время как на более крупных островках клетки дифференцировались в остеогенном направлении [Steward A.J., Kelly D.J., 2015].

Предполагают, что рецепторами для передачи механического сигнала от внешней стороны клетки через мембрану к ее внутренней части являются интегрины. Кроме того, могут быть вовлечены и другие рецепторы, которые, как известно, являются механочувствительными, включая ионные каналы [Lee H.J. et al., 2013]. Внутри клетки миозиновые молекулы,

цитоскелетные связывающие, полимеризующиеся и регулирующие элементы, цитоскелетные филаменты, кавеолы, транскрипционные кофакторы YAP/TAZ, и другие сигнальные молекулы потенциально являются частями механосенсорного процесса [Lee H.J. et al., 2013; Lee-Thedieck C., Spatz J.P., 2014].

КМ имеет высокую структуру не только на макроскопическом, но и на молекулярном и, следовательно, нанометровом уровне. Для клеток, находящихся в контакте с КМ, это означает, что они ощущают, помимо описанного выше биохимического состава и механических свойств КМ, также его наноструктурные особенности [Lee-Thedieck C., Spatz J.P., 2014]. По сравнению с зависимыми от прикрепления клетками, такими как фибробласты, ССК или остеобласты, относительно мало исследований изучали влияние таких особенностей на ГСК.

Ниша ГСК в природе представляет собой трехмерную структуру. ЭЦМ в этой трехмерной среде воздействует на ГСК, окружая их со всех сторон, что приводит к ограничению пространства, увеличению доступности матрицы и более высокой плотности ячеек, чем при 2D расположении. Более того, трехмерная матрица вокруг клеток приводит к ограниченной диффузии и установлению градиентов растворимых факторов, что обеспечивает эффективную ауто- и паракринную передачу сигналов между клетками [Lee-Thedieck C., Spatz J.P., 2014; Nelson M.R., Roy K., 2016]. Все эти факторы способствуют влиянию трехмерной структуры ЭЦМ на ГСК. Чтобы добиться более естественного поведения ГСК, было предпринято множество попыток создать более подобную *in vivo* среду для ГСК. Первым шагом на пути к этой цели является понимание того, как трехмерная среда влияет на поведение ГСК. Несмотря на то, что существует обширная информация об отдельных регуляторных путях, контролируемых факторами роста, гормонами, цитокинами и их рецепторами, точные инструменты пока недоступны для расшифровки и понимания множественных синергических эффектов,

включая биомеханические сигналы, топографическую информацию и сигналы, полученные от ЭЦМ или контактов поверхности [Park J. et al., 2012].

Интегрированная модель гемопозитической ниши (мышинной и человеческой), которая учитывает специфический вклад всех предполагаемых клеток ниши, в настоящее время недоступна.

1.9. Роль искусственного матрикса в механизмах межклеточного взаимодействия

Металлические искусственные имплантаты широко используются в качестве медицинских устройств для замены, поддержки или улучшения существующей биологической структуры кости. Branemark P.-I. впервые открыл принципы остеоинтеграции в 1950-х годах [Branemark P.-I., 1983]. Чистый титан (Ti) помещали в малоберцовую кость кролика, соединяли непосредственно с костью. Отмечалось, что он не вызывал серьезных воспалительных или других реакций в коже или костных тканях. Это уникальное свойство титана, позволяющее развивать прямой контакт и соединение между живой костью и металлической поверхностью без контакта с мягкими тканями, в настоящее время имеет множество применений: таких как зубные имплантаты, черепно-лицевые протезы, замена тазобедренного сустава и т.д. [Le V.Q. et al., 2014].

Использование титана в качестве биоматериала возможно из-за его очень благоприятной биосовместимости с живой тканью. Имплантаты из титана, имеющие на своей поверхности кальций-фосфатные покрытия, демонстрируют хорошую фиксацию к кости [Narayanan R. et al., 2008].

Все материалы имплантатов, предназначенные для биоактивного применения, должны иметь шероховатую поверхность. Когда поверхность имплантата не обладает высокой биоактивностью, необходимо

оптимизировать такие свойства поверхности, как химическая чистота и топография, чтобы улучшить уровень остеоинтеграции, а также сократить время, необходимое для образования связи с костью. Металлические имплантаты можно модифицировать с помощью таких методов, как пескоструйная обработка, для увеличения площади поверхности имплантата и оптимизации процесса остеоинтеграции [Narayanan R. et al., 2008].

Гладкие поверхности приводят к плохой адгезии костей, в то время как шероховатые поверхности (на уровне, допускающем врастание сосудов) будут способствовать остеоинтеграции [Marcelo H. et al., 2003].

Клеточная адгезия представляет собой фундаментальный процесс, непосредственно участвующий в росте, миграции и дифференцировке клеток. Адсорбция белка является начальным событием, происходящим при контакте поверхности биоматериала с биологической средой. Фибронектин – гликопротеин, вырабатываемый многочисленными клетками, включая остеобласты, играет важную начальную роль во взаимодействии между поверхностями имплантата и окружающей биологической средой. Фибронектин быстро связывается с открытыми поверхностями оксида титана *in vitro*, и присутствие этого белка даже на низком уровне усиливает связывание клеток. Реакции переноса заряда адсорбированных белков и возникающие в результате конформационные изменения являются основными причинами иммунологических реакций, вызываемых имплантатами. Топография поверхности имплантата влияет на пролиферацию, дифференцировку остеобластов и экспрессию белков внеклеточного матрикса [Narayanan R. et al., 2008].

Нанесение кальций-фосфатных (Са-Р) покрытий на поверхность имплантатов привлекло значительное внимание из-за их химического сходства с природным минералом кости. Покрытия на основе Са-Р демонстрируют способность соединяться непосредственно с костной тканью

и усиливать биохимическое сцепление между костью и материалом покрытия [López-Valverde N. et al., 2021].

С 1960-х годов фосфаты кальция (Са-Р), в основном, гидроксипатит (ГА) широко использовались в хирургии костей, поскольку они легко связываются с костью после имплантации. В конце 80-х годов разработка остеокондуктивных покрытий плазменного напыления ГА на металлических имплантатах позволила улучшить биологическую совместимость металлической поверхности [Le V.Q. et al., 2014].

Было показано, что Са-Р покрытия на титановых имплантатах улучшают их биофункциональность, способствуя остеоинтеграции и долговечности, поэтому существующая теория в отношении этого типа покрытия заключается в том, что биологическая интеграция улучшается, когда структура имитирует кость [López-Valverde N. et al., 2021].

Са-Р в форме апатита является основным минеральным компонентом (~69%) натуральной кости. Однако он не является остеоиндуктивным, и его активность ограничивается остеокондукцией, хотя было показано, что в сочетании с факторами роста и биоактивными белками он может быть остеоиндуктивным [Wang D. et al., 2017].

Ультраструктурные наблюдения показали, что Са-Р покрытия частично растворяются, насыщая жидкости организма в области вокруг имплантата растворимыми ионами и приводя к двойному осаждению биологического апатита, который может служить субстратом для костеобразующих клеток, единственная трудность заключается в согласовании растворения покрытия со скоростью заживления для достижения идеального прилегания кости к поверхности титана [López-Valverde N. et al., 2021].

Различные компоненты ЭЦМ показали себя как эффективные материалы для улучшения работы ортопедических имплантатов. Коллаген 1 типа является одним из наиболее изученных материалов. Коллаген 1 типа является основным компонентом костного

матрикса, составляя до 80% белка в матрице. Остеобласты и ССК, выращенные на металлах, покрытых коллагеном 1 типа, демонстрируют улучшенную клеточную адгезию. Металлические имплантаты, покрытые коллагеном 1 типа, также способствуют остеоинтеграции. Эффект покрытия коллагеном 1 может быть дополнительно усилен сульфатированной молекулой хондроитинсульфата внеклеточного матрикса хряща [Zhang B.G.X. et al., 2014].

В последнее время появилась тенденция к объединению BMP2 и фосфата кальция с молекулами экстрацеллюлярного матрикса, в т.ч. с коллагеном и биоразлагаемыми полимерами, в качестве покрытия для имплантатов. Эти новые способы доставки факторов роста замедляют скорость высвобождения BMP2, что показывает многообещающие результаты в остеоиндукции на различных моделях животных [Bae S.E. et al., 2012]. Остеобласты, выращенные на таких поверхностях, также демонстрируют усиленную пролиферацию и дифференцировку [Zhang B.G.X. et al., 2014].

Тем не менее, есть некоторые недостатки, связанные с использованием молекул экстрацеллюлярного матрикса. Во-первых, большинство молекул внеклеточного матрикса имеют биологическое происхождение и увеличивают риск непреднамеренного введения микробов и инфекционного материала в организм человека во время имплантации. Во-вторых, молекулы, полученные биологическим путем, имеют значительные отличия основных характеристик от партии к партии [Zhang B.G.X. et al., 2014]. В связи с этим, в клинической практике применяются медицинские изделия из инертных материалов.

Таким образом, пролиферация, дифференцировка и выживание прикрепленных клеток тесно зависят от взаимодействия клеток с ЭЦМ или соседними клетками. Поэтому наноразмерные модификации поверхности на биомиметических материалах все чаще привлекают внимание специалистов в

области тканевой инженерии, например, при разработке биомиметических материалов для сосудистых трансплантатов, стентов или костных имплантатов. С другой стороны, продукты биodeградации искусственных имплантатов с кальций-фосфатным покрытием, применяемых для регенерации костной ткани, такие как Ca^{2+} и фосфаты, также оказывают дистантный регуляторный эффект на клеточные культуры [Шаркеев Ю.П. и др., 2014].

1.10. Влияние 3D-культуры клеток на потенциал костной регенерации стромальных стволовых клеток

Традиционная двумерная (2D) культура клеток на плоских пластиковых или стеклянных поверхностях до сих пор широко используется в регенеративной медицине и фундаментальных исследованиях стромальных стволовых клеток. Однако удаление стволовых клеток из их эндогенной трехмерной ниши приводит к неестественной полярности, изменениям в кинетике роста и, что не менее важно, к изменению потенциала дифференцировки. Также известно, что 2D-культура ССК приводит к потере мультипотентности и преждевременному клеточному старению [Turinetti V. et al., 2016]. Более того, условия 2D-культуры клеток связаны с накоплением хромосомных aberrаций в геноме ССК [Bara J.J. et al., 2014; Bicer M. et al., 2021]. Несмотря на то, что 2D-культивирование клеток очень распространено и применяется более 100 лет, известно, что клеточные культуры, культивируемые на пластиковых поверхностях, не соответствуют поведению клеток *in vivo* [Litvinova L.S. et al., 2018].

Было показано, что влияние 3D-культивирования на жизнеспособность и пролиферацию клеток зависит от типа клеточных культур. В то время как в некоторых исследованиях сообщалось об увеличении жизнеспособности и

пролиферации по сравнению с соответствующими контролями 3D, в других наблюдались противоположные эффекты [Edmondson R. et al., 2014; Bicer M. et al., 2021].

В целом, эффекты в 3D-культуре зависят от множества факторов, включая, помимо прочего, природу каркаса и источник происхождения ССК [Bicer M. et al., 2021].

Многочисленные исследования показывают, что помимо влияния на жизнеспособность и пролиферацию ССК 3D-культивирование может оказывать воздействие на их остеогенную дифференцировку. Предполагается, что 3D-культивирование клеток может увеличивать остеогенную дифференцировку по сравнению с традиционной 2D-культурой [Bicer M. et al., 2021].

Было продемонстрировано, что культивирование ССК-КМ крыс в виде сфероидов приводило к увеличению остеогенного потенциала по сравнению с 2D-контролем [Yamaguchi Y. et al., 2014]. Об этом свидетельствует более высокая экспрессия *Osterix*, повышенная активность щелочной фосфатазы и более высокий уровень минерализации *in vitro*.

В исследовании Sefcik L.S. и соавт. (2008) были представлены доказательства того, что 3D-нанофибриллярные каркасы, приготовленные из коллагена хвоста крысы, увеличивают экспрессию остеогенных маркеров, включая коллаген типа I, остеопонтин (OPN) и остеоонектин, в ССК человека по сравнению с результатами, полученными при оценке 2D-модели [Sefcik L.S. et al., 2008]. Аналогичные эффекты на уровень экспрессии остеокальцина, OCN и OPN наблюдались в ССК костного мозга крыс при использовании 3D каркаса очищенного коллагена [Han S. et al., 2012]. В 2012 году Nguyen L.T. и его коллеги показали, что дифференцировка ССК в 3D-модели значительно увеличивает экспрессию OCN и OPN и увеличивает уровень кальцификации по сравнению с клетками, выращенными в 2D-культуре [Nguyen L.T. et al., 2012; Persson M. et al., 2018].

Также были проведены исследования с использованием различных субстратов на основе поликапролактона в сочетании с ССК. Было показано, что эластичный 3D поли (ε-капролактон) увеличивает экспрессию костного сиалопротеина и OCN в ССК костного мозга мини-свиней в 3D-культуре [Brennan M.A. et al., 2015; Shekaran A. et al., 2015]. Также имеются результаты об усилении остеогенной дифференциации ССК в 3D-культуре по сравнению с 2D-культурой, если в качестве каркаса использовать желатин и смеси желатина и альгината [Lo Y.P. et al., 2016; Wang X.F. et al., 2016].

Было высказано предположение, что помимо прямого влияния на характеристики ССК 3D-культура клеток модулирует также регенеративный потенциал их секретомы [Bicer M. et al., 2021].

Хотя есть некоторые доказательства того, что 3D-культивирование в виде сфероидов может снизить противовоспалительный и иммуномодулирующий потенциал ССК [Burand A.J. et al., 2020], большинство секретомов, продуцируемых ССК, культивированных в 3D-гидрогелях, по-видимому, обладают более высокими противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами и в целом более высокой регенеративной способностью [Bicer M. et al., 2021].

Группой исследователей в составе с Redondo-Castro E. (2018) также было показано, что 3D-сфероидные культуры человеческих ССК костного мозга секретуют более высокий уровень VEGF по сравнению с 2D-культурами [Lee J.H. et al., 2016; Redondo-Castro E. et al., 2018; Young S.A. et al., 2018].

Сравнительный анализ секретомов ССК пуповины, культивируемых в виде сфероидов и в виде прикрепившегося монослоя, показал, что 3D-культивирование значительно увеличивает секрецию LIF, IL-10, I-309, FGF-2, SCF и GM-CSF [Miranda J.P. et al., 2017]. Более того, это исследование также показало, что секретом из 3D-культивированных ССК обладает

превосходным регенеративным и противовоспалительным потенциалом на модели артрита *in vivo* у взрослых крыс линии Wistar [Bicer M. et al., 2021].

В целом, 3D-культивирование связано с повышенным уровнем секретируемых молекулярных факторов, которые имеют решающее значение для регенерации кости. Таким образом, результаты, обобщенные выше, позволяют предположить, что 3D-культивирование действительно может повысить уровень факторов, связанных с регенерацией кости, в секрете ССК [Bicer M. et al., 2021].

Известно, что в дополнение к биохимическим сигналам на судьбу стволовых клеток сильно влияют механофизические сигналы, включая поверхностную жесткость и наличие микро- и наноразмерных пор [Moghaddam M.M. et al., 2019]. *In vivo* многие из этих сигналов обеспечиваются внеклеточным матриксом и включают жесткость матрикса и наличие пор, ямкообразных структур на микро- и наноуровне (макро- и нанотопография). Жесткость ЭЦМ в организме человека колеблется от 0,1–1 кПа в мозге до 25–40 кПа в остеоидах (неминерализованная органическая часть костного матрикса, развивающаяся до созревания костной ткани) [Engler A.J. et al., 2006]. Напротив, обычный пластиковый материал для клеточных культур очень жесткий и имеет жесткость 1–10 ГПа [Gilbert P.M. et al., 2010; Bicer M. et al., 2021]. Действительно, было описано, что ССК очень чувствительны к жесткости подложки. Однако сообщения об оптимальной остеоиндуктивной жесткости противоречивы. Так, например, группа исследователей показала, что жесткость 4,47 кПа является остеоиндуктивной [Mirbagheri M. et al., 2019], в исследованиях других лабораторий был предложен гораздо более высокий модуль Юнга в диапазоне от 62 до 800 кПа [Younis L.T. et al., 2018; Whitehead J. et al., 2020].

Интересно, что физические свойства каркасов также могут определять паракринный потенциал ССК [Seib F.P. et al., 2009]. Так, субстраты с эластичностью 20 кПа, потенцируют увеличение экспрессии

противовоспалительных факторов по сравнению с более эластичными субстратами с эластичностью 2 кПа [Bicer M. et al., 2021].

Важно отметить, что хотя жесткостью можно манипулировать в 2D-культуре для изучения дифференцировки ССК [Schellenberg A. et al., 2014], важно учитывать, что *in vivo* ССК подвергаются механофизическим воздействиям во всех трех измерениях окружающей ниши. Следовательно, сфероидные культуры и гидрогели, окружающие клетки, могут обеспечивать более сильные индуктивные сигналы по сравнению с более искусственной средой в 2D-культуре [Bicer M. et al., 2021].

Помимо жесткости, индуктивную роль в дифференцировке клеток играют как макро-, так и нанотопография ниши стволовых клеток.

В этом контексте было установлено, что нанопоры диаметром 30 нм внутри эластичных (коллаген) и жестких поверхностей (титан) являются сильными остеоиндуктивными сигналами для взрослых стволовых клеток [Greiner J.F. et al., 2019; Vordemvenne T. et al., 2020]. Интересно, что электронно-микроскопический анализ структуры различных гидрогелей, включающих различные формы нанофибриллярной целлюлозы и фибрина, выявил наличие как нано-, так и микропор [Azoidis I. et al., 2017; Sheard J.J. et al., 2019; Bicer M. et al., 2021]. В связи с этим, эти наноскопические и микроскопические особенности могут дать потенциальное объяснение повышенному остеогенному потенциалу ССК в 3D-культуре [Bicer M. et al., 2021]. Примечательно, что различия в профилях нано-, микро- и макропор различных каркасов могут оказывать влияние на диффузию питательных веществ, кислорода и могут объяснить различия в жизнеспособности и пролиферации клеток [Bicer M. et al., 2021].

В 3D-культуре сохранение секретируемых растворимых факторов также может способствовать увеличению остеогенного потенциала. Действительно, было показано, что гидрогели гиалуроновой кислоты, модифицированные пептидами, демонстрируют положительные

терапевтические результаты на животных моделях повреждения спинного мозга [Li L. et al., 2020]. Аналогичным образом, экстрацеллюлярные везикулы, полученные из ССК пуповины, инкапсулированные в функциональные пептидные гидрогели, увеличивают стабильность экзосом и улучшают функцию сердца на модели инфаркта миокарда у крыс [Han C. et al., 2019]. Недавно было продемонстрировано, что альгинатные гидрогели, полученные из ССК, могут способствовать регенерации тканей в полнослойных кожных ранах [Shafei S. et al., 2020]. Наконец, было показано, что целлюлозные гидрогели удерживают экстрацеллюлярные везикулы и обеспечивают их непрерывное высвобождение из инкапсулированных клеток [Zavala G. et al., 2020]. Таким образом, потенциальным дополнительным механизмом повышения остеогенного потенциала ССК в 3D-гидрогелях может быть сохранение растворимых проостеогенных факторов и экстрацеллюлярных везикул. Это может проявлять как аутокринные, так и паракринные эффекты, которые стимулируют остеогенез в 3D-культуре [Zavala G. et al., 2020].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кость является метаболически активной тканью, постоянно обновляющейся у здоровых индивидуумов при участии клеток иммунной системы. Ремоделирование скелета человека – процесс, с помощью которого кости изменяют форму или размер в ответ на физиологические воздействия или механические силы, с которыми сталкивается скелет в течение жизни. Ремоделирование кости помогает сохранять ее прочность и минеральный гомеостаз [Katsimbri P., 2017].

В последнее время многие исследования продемонстрировали сложные взаимодействия между иммунной и скелетной/костной системами. Иммунные клетки и секретируемые ими цитокины способствуют

регуляции костного гомеостаза, а костные клетки, включая остеобласты, остеокласты, остеоциты и ССК, также влияют на клеточные функции иммунных клеток. Эти механизмы перекрестных взаимодействий между костью и иммунной системой сформировали новую область исследований под названием остеоиммунология [Tsukasaki M., Takayanagi H., 2019; Yang N., Liu Y., 2021].

Стволовые клетки и клетки-предшественники играют особую роль в поддержке роста и восстановления костей в зависимости от стадии костного ремоделирования [Ono N. et al., 2019].

Показано, что иммунные клетки присутствуют в очаге регенерации на протяжении всего процесса костного ремоделирования. Остеобласты постоянно образуют новую кость, обеспечивая структурную платформу для поддержания ГСК в костном мозге [Inada Y. et al, 2023].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект и материал исследования

Материалом для исследования служили культуры иммунокомпетентных клеток человека, полученных из лейкозвеси, и стромальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани человека (далее ССК). Работа с культурами клеток человека проводилась в соответствии с соблюдением этических и юридических принципов проведения медико-биологических исследований с использованием биоматериала человека, которые приняты на территории Российской Федерации, а также согласно Хельсинской декларации ВМА (2000 г.) и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999 г.), с полным соблюдением конфиденциальности и информированием пациентов. Разрешение на проведение исследования получено в соответствии с одобрением комиссии по этике Балтийского федерального университета им. И. Канта (**протокол №1 от 28.02.2019**). Предварительно нами были получены информированные согласия условно здоровых доноров на участие в исследовании и использовании биообразцов: периферической крови (15 мл) и биообразцов подкожной жировой ткани (липоаспират, 50 мл). В исследование были включены 18 здоровых доноров, из них: 8 мужчин (средний возраст $32,4 \pm 2,3$ лет, индекс массы тела $24,1 \pm 2,8$) и 10 женщин (средний возраст $28,5 \pm 3,1$, индекс массы тела $23,8 \pm 3,2$). Взятие биоматериала проводилось во время выполнения эстетических операций, а именно: А16.01.034. Пластика подкожной жировой клетчатки методом перемещения микрочастиц собственного жира (липофилинг) или А16.01.034. Удаление подкожно-жировой клетчатки (липосакция) в клинике МЛДЦ 'Особый Статус' (ООО ПервыйМед) (главный врач – канд. мед.наук Иванов П.А.).

Критериями исключения из исследования являлись: возраст моложе 21 года и старше 35 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости.

Все исследования были проведены на базе Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ОНК «МЕДБИО» БФУ им. И. Канта (директор Центра – д-р мед. наук, Л.С. Литвинова).

Для моделирования границы раздела кость/кровотворное микроокружение использовали трёхмерный матрикс с кальций-фосфатным покрытием (КФ).

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

2.2. Получение культуры иммунокомпетентных клеток из цельной крови человека

В качестве нормальных иммунокомпетентных клеток, используемых для создания модели физиологической регенерации *in vitro*, использовали мононуклеарные лейкоциты (МНК). Выделение МНК из лейкоцези здоровых доноров проводили стандартным методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077$ г/см³). Венозную гепаринизированную кровь (20 ЕД/мл) смешивали с 0,9% физ. раствором (NaCl) в соотношении 1:1. Полученную разведенную кровь наслаивали на градиент фиколл-урографина (1,077 г/см³) в соотношении 1:3 и центрифугировали при 1500 об/мин 45 мин на мультифункциональной центрифуге с охлаждением Thermo Jouan CR3i (Thermo Fisher Scientific,

США). Образовавшееся интерфазное кольцо из моноклеарных клеток собирали автоматической пипеткой с границы раздела фаз в стерильную пробирку и дважды отмывали 0,9% раствором NaCl, последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 15 мин при 1500 об/мин.

Тщательно слив надосадочную жидкость, полученную взвесь моноклеарных клеток довели фосфатно-солевым буфером (с 0,5% BSA «Miltenyi Biotec», Германия) до 1 мл и в дальнейшем использовали для выделения фракций, свободных от CD14+ клеток.

Для избавления смеси моноклеаров от CD14+-клеток (моноцитов) был использован метод позитивной иммуномагнитной селекции с применением автоматического магнитного сепаратора AutoMACS Pro Separator Instrument («Miltenyi Biotec», Германия) и моноклональных антител к CD14+ с парамагнитными частицами (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Для этого к выделенной ранее суспензии моноклеарных клеток (80 мкл взвеси содержала не менее 10^7 кл), добавляли 20 мкл магнитных частиц к CD3 (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия), согласно протоколу производителя. Суспензию с магнитными частицами инкубировали 15 мин в темноте при +40° С. После инкубации клетки отмывали в 2 мл буфера PBS (с 0,5% BSA, «Miltenyi Biotec», Германия) и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Затем сливали надосадочную жидкость и добавляли 500 мкл буфера в клеточную суспензию, тщательно ресуспендируя.

Отсутствие моноцитов (CD14) и В-лимфоцитов (CD19) в культурах Т-клеток до культивирования было подтверждено с использованием метода проточной цитофлуориметрии с применением моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE, PE-Cy7 и PerCP («Abcam», Великобритания и «e-Bioscience», США). Детекцию мембранных молекул проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия), в

соответствии с протоколом производителя. В эксперименте были использованы клеточные культуры, с содержанием CD3 лимфоцитов более 97%.

2.3. Получение культуры стромальных стволовых клеток из липоаспирата жировой ткани человека

ССК получали из липоаспирата человека по методике [Zuk P.A. et al., 2001], с помощью механической и ферментативной дезагрегации тканей.

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

Анализ соответствия полученных клеток популяции ССК проводился согласно морфологическим критериям по предписанию International Society for Cellular Therapy (ISCT) [Dominici M. et al., 2006].

Для оценки и подтверждения соответствия культуры выделенных клеток ССК применяли совокупность следующих критериев:

- 1) жизнеспособность клеток в культуре более 95%;
- 2) способность клеток дифференцироваться в основные клеточные направления: хондроцитарное, адипоцитарное и остеоцитарное;
- 3) способность клеток к адгезии;
- 4) экспрессия поверхностных рецепторов ССК - CD73/CD90/CD105 более чем у 95 % клеток с одновременным отсутствием экспрессии маркеров, специфичных для гемопоэтических клеток - CD45/CD34/CD20/CD14 (не более 1%).

Настоящий эксперимент был проведен с использованием клеток, имеющих доказанную принадлежность к популяции ССК с жизнеспособностью более 95%.

2.4. Оценка жизнеспособности клеточных культур

Для анализа уровня живых, апоптотических и мертвых клеток в разных экспериментальных культурах применяли метод проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием проточного цитофлуориметра «MACSQuantAnalyzer» («Miltenyi Biotec», Германия).

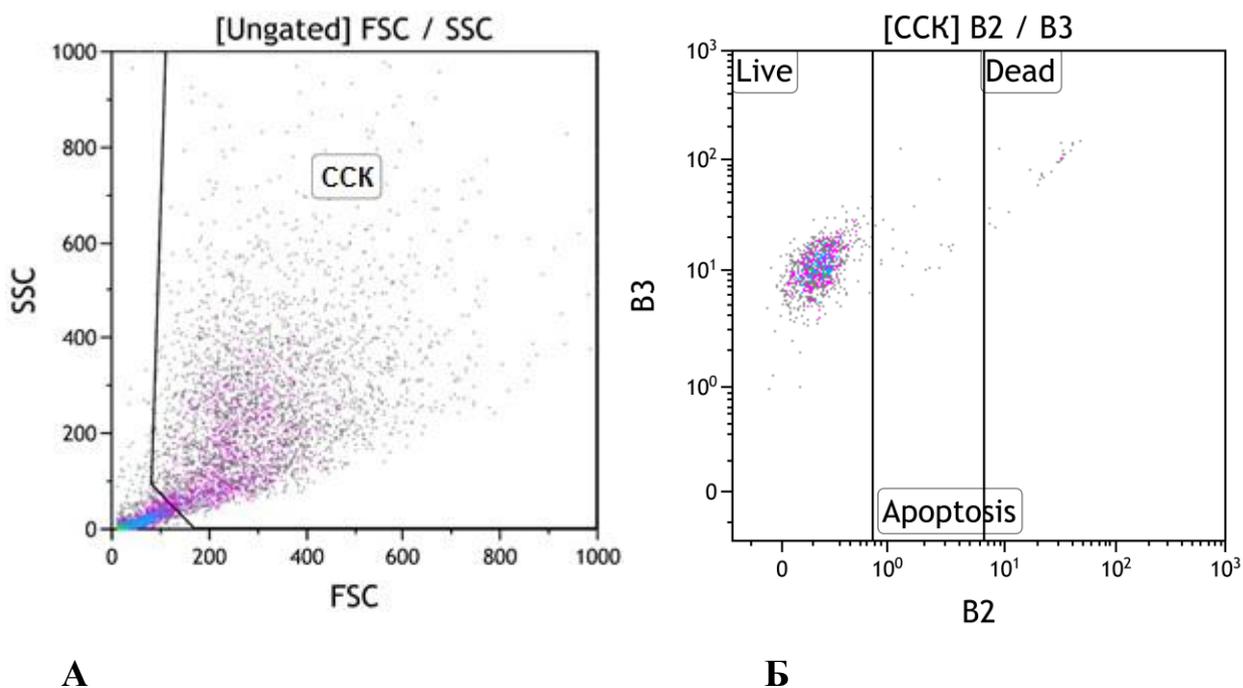


Рисунок 7. Варианты гейтирования стромальных стволовых клеток человека («GuavaViacount», «Millipore», США). А – Распределение событий по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию с гейтированием (зона ССК). Б – Распределение событий из гейта ССК по интенсивности флуорисценции каналов B2 и B3 с гейтированием живых (Live), апоптотических (Apoptosis) и мертвых клеток (Dead)

Для оценки жизнеспособности клеток использовали набор реагентов «ViaCount Reagent» («Millipore», США). Дифференциальная проницаемость для ДНК-связывающих красителей позволяет разграничивать живые и мертвые клетки в любых клеточных суспензиях.

По истечении времени культивирования, в соответствии с дизайном эксперимента, клеточные образцы тщательно ресуспендировали и отбирали 12,5 мкл клеточной взвеси. К аликвоте клеточной взвеси добавляли 125 мкл ViaCount Reagent («Millipore», США), тщательно ресуспендировали и оставляли для инкубации в темном месте при комнатной температуре на 5 минут. Далее полученные образцы анализировали на проточном цитометре «MACSQuantAnalyzer» («Miltenyi Biotec», Германия), в соответствии с руководством протокола производителя.

2.5. Подсчет общего числа клеток в экспериментальных культурах

Общее количество клеток (ОКК) в экспериментальных культурах считали с использованием автоматического счётчика клеток (Countess TM Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с применением красителя трипанового синего 0.4% (Trypan blu) («Invitrogen», США).

Для оценки общего количества клеток в экспериментальных культурах, 10 мкл клеточной суспензии смешивали с 10 мкл раствора 0.4% трипанового синего. Полученную смесь помещали в камеру рабочего слайда (толщина 100 мкм), который ставили в гнездо прибора. Оценка результатов проводилась автоматически, с выводением результатов анализа на экран прибора.

Результаты анализа выражали в 10^4 кл/мл.

2.6. Детекция дифференцировки стромальных стволовых клеток

Для определения дифференцировочной принадлежности полученной культуры клеток к пулу ССК клетки ($0,15 \times 10^4$ кл/мл) культивировали в течение 21 суток в 6-ти луночных планшетах в 2 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 (рис. 8).

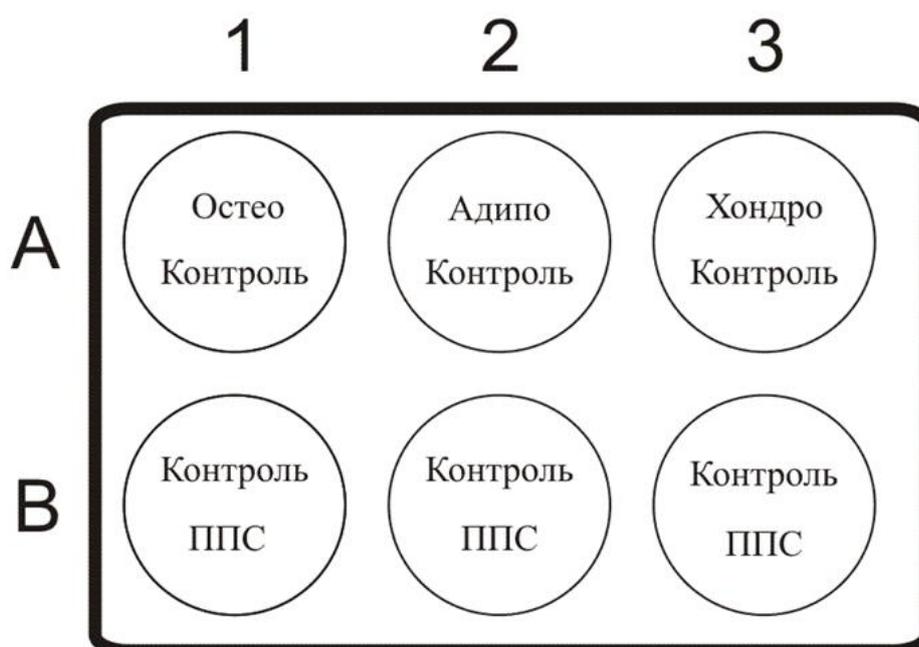


Рисунок 8. Схематичное изображение экспериментального планшета для определения дифференцировочной принадлежности культуры клеток, выделенных из липоасpirата жировой ткани у условно здорового донора, к популяции стромальных стволовых клеток.

По истечении срока инкубирования (21 сутки) из планшетов аккуратно отбирали ППС, избегая повреждение клеточного монослоя. Для фиксации культуры клеток, перед окраской использовали забуференный 10% формалин (инкубация 20-60 минут). После фиксации клеточный монослой промыли два раза раствором PBS. Для определения дифференцировочного потенциала ССК в хондрогенном, остеогенном или адипогенном направлениях, при комнатной температуре производилось окрашивание клеток раствором альцианового синего («Sigma-Aldrich», США); ализарина красного («Sigma-Aldrich», США); масляного красного («Sigma-Aldrich», США). Голубая окраска культур после действия раствора альцианового синего («Sigma-Aldrich», США) подтверждает синтез протеогликанов хондроцитами. Окрашивание раствором ализарина красного («Sigma-Aldrich», США) свидетельствует об осаждении кальция клетками и показывает минерализацию межклеточного вещества. Проявление раствора масляного красного («Sigma-Aldrich», США) демонстрирует присутствие нейтральных триглицеридов и липидов в межклеточном веществе.

По истечении времени инкубации раствор красителя аспирировали дозатором, а монослой клеток два раза промывали деионизованной водой.

Итоги окрашивания монослоя клеточной культуры ССК подтверждали с применением светового микроскопа.

Выраженность окрашивания соотносили с интактной культурой клеток, инкубация которой проводилась с использованием ППС без дифференцировочных добавок.

Дифференцировочная идентификация клеток, при окрашивании монослоя, после 21 дневного культивирования в дифференцировочной среде, выявила способность ССК к дифференцировке в клетки мезодермальной природы (остео-, адипо- и хондро направления) (рис. 9).

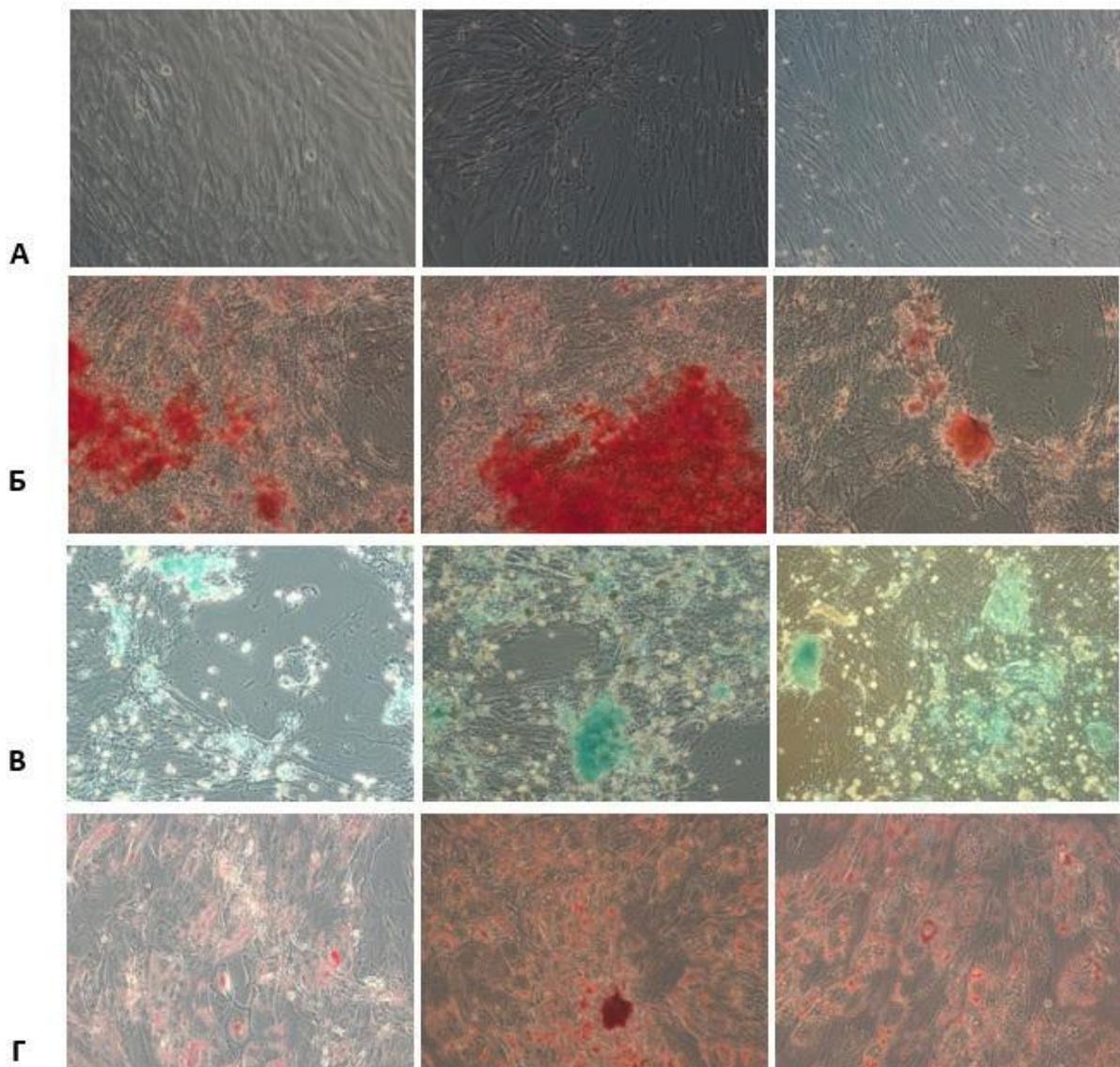


Рисунок 9. Оценка дифференцировочного потенциала стромальных стволовых клеток, выделенных из липоасpirата жировой ткани у условно здорового донора, по истечении 21 суток культивирования в: (А) в стандартной среде культивирования; (Б) в остеогенной среде (участки с минерализованным межклеточным веществом окрашены Alizarin Red); (В) в хондрогенной среде (гликопротеины окрашены Alcian Blue); (Г) в адипогенной среде (нейтральные триглицериды с окраской Oil Red и липиды)

ССК также имели фибробластоидную морфологию и адгезировались к пластику при стандартных условиях культивирования.

2.7. Проведение фенотипической идентификации выделенного пула стромальных стволовых клеток

Для оценки фенотипического профиля первичной культуры клеток, полученной из липоасpirата человека, был проведен анализ классических маркеров стромальных (CD105, CD73, CD90) и гемопоэтических (CD45, CD14, CD20, CD34) клеток. Фенотипирование клеток производили с применением коммерческого набора MSC Phenotyping Kit human («Miltenyi Biotec», Германия). В состав этого набора входят 2 коктейля: первый (1) содержит меченый изотип-контроль, который необходим для доказательства отсутствия неспецифического связывания антител; второй (2) - антитела, которые характерны для ССК (CD73, CD90, CD105) и гемопоэтических клеток (CD14, CD20, CD34, CD45).

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

После инкубации клетки ферментировали 0,05% трипсина («ПанЭко», Россия), который был разведен в 0.53 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich, США), после чего клетки дважды отмывали фосфатным буфером.

Далее клеточную культуру тщательно ресуспендировали с применением автоматического дозатора, после чего 50 мкл клеточной взвеси переносили в микроцентрифужные пробирки (типа эппендорф) и добавляли в каждую микропробирку по 1 мкл коктейля (pH=7,4) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Клетки инкубировали в темном месте при температуре 4°C в течение 10 мин. Далее в исследуемые образцы добавляли по 1 мл фосфатно-солевого буфера и центрифугировали в течение 5 мин при комнатной температуре и скорости 1500 об/мин. После чего отбирали надосадочную жидкость, и вносили в клеточную суспензию фосфатно-солевой буфер, доводя общий объем клеточного образца до 200 мкл. Образцы клеточных суспензий подвергались тщательному ресуспендированию, после чего их переносили в лунки 96-ти луночного планшета в соответствии с протоколом исследования. Оценка фенотипического профиля клеток производили с применением проточного цитофлуориметра MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия).

Гейтирование интересующей клеточной популяции проводили в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат). Далее проводили анализ исследуемой популяции клеток на наличие флуоресценции в разных координатах (флуоресценция по трем цветам на основе Dot Plot, либо по одному цвету на основе гистограммы) (рис. 10). Сбор данных выполняли до тех пор, пока не набиралось 10 000 событий в области интереса (то есть. 10 000 клеток). Аналитическую работу проводили с применением автоматического программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США).

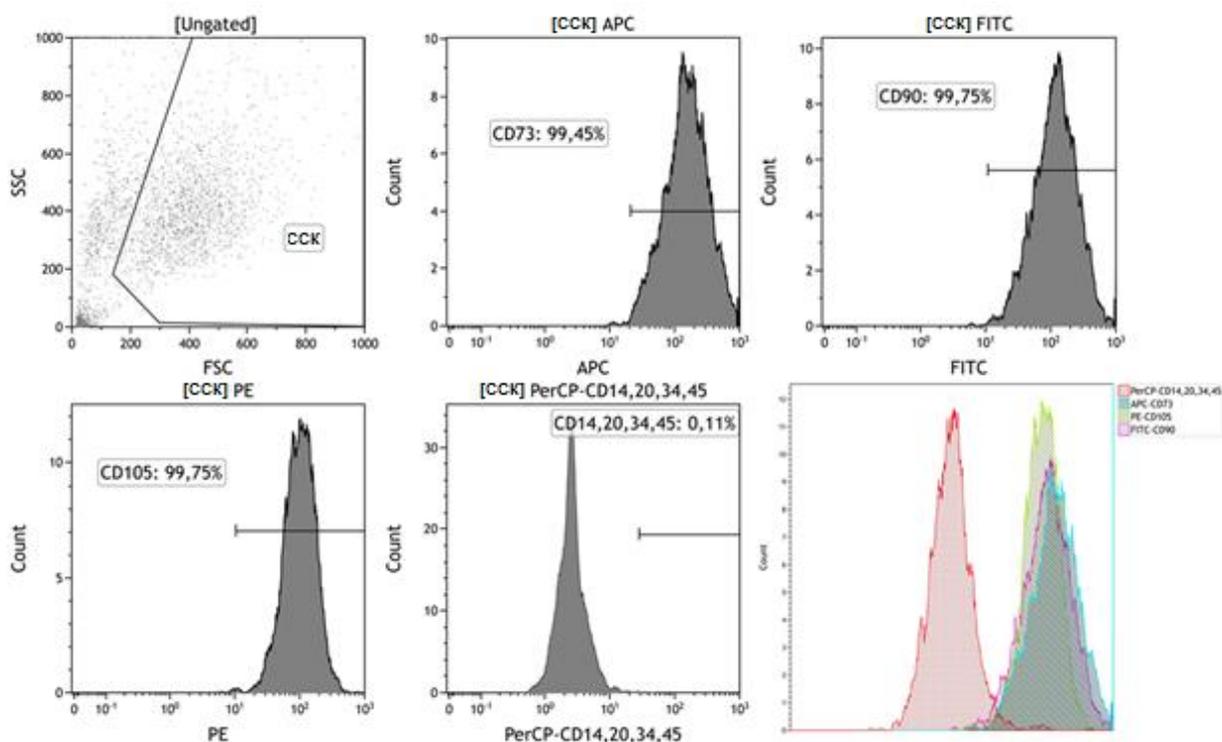


Рисунок 10. Тактика выявления популяций стромальных стволовых клеток контрольного образца.

1. оценка распределения клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию проведена с применением гейтинга живой популяции клеток (Live). Ось абсцисс показывает прямое светорассеяние, оценка которого позволяет определить размер клеток; ось ординат – боковое светорассеяние, благодаря которому можно оценить структуру цитоплазмы клеток.

2. оценка проведена с использованием гейтирования стромальных стволовых клеток. Гистограммы распределения стромальных стволовых клеток были получены с применением Isotype Control Cocktail, human.

3. оценка проведена с применением гейтирования стромальных стволовых клеток. Гистограммы распределения стромальных стволовых клеток, полученные с применением MSC Phenotyping Cocktail, human и CD90-APC-Vio770

На рис. 10 показаны гистограммы распределения ССК, полученные в результате многоцветного анализа с использованием CD90-APC-Vio770 и коктейля моноклональных антител – MSC Phenotyping Kit, human.

Результаты фенотипической идентификации показали, что более 97% клеток несли на своей поверхности маркеры CD73, CD90 или CD105 и менее 3% клеток в исследуемой культуре экспрессировали молекулы CD45, CD34, CD20 и CD14.

Таким образом, культура ССК, которая была получена из липосапирата человека, отвечала минимальным критериям, предъявляемым Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [Dominici M.,2006].

2.8. Экспериментальное 2D и 3D культивирование клеток

2.8.1. Двухмерная модель культивирования

Двухмерная модель культивирования служила контролем для оценки морфофункционального состояния клеток, культивируемых с использованием трехмерной модели.

Культивирование иммунокомпетентных клеток (1×10^6 кл/лунку) проводили в 12-ти луночных планшетах («Orange Scientific», Бельгия) в полной питательной среде (ППС). ППС состояла из α -MEM («Sigma-Aldrich», США), 10% инактивированной (56°C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров («Sigma-Aldrich», США), 2mM/л L-глутамина («Sigma-Aldrich», США), 100 Е/мкг/мл пенициллин/стрептамицин («Gibco Life Technologies», США).

Для формирования точки роста ССК, в планшет вносили 50 мкл клеточной суспензии в центр пустой лунки согласно протоколу. По истечении двух часов лунки планшета промывали физиологическим раствором (0,9% NaCl) для удаления клеточного дебриса. Параллельно проводили подготовку трехмерных искусственных матриц с КФ покрытием, имитирующих регенерирующую костную ткань.

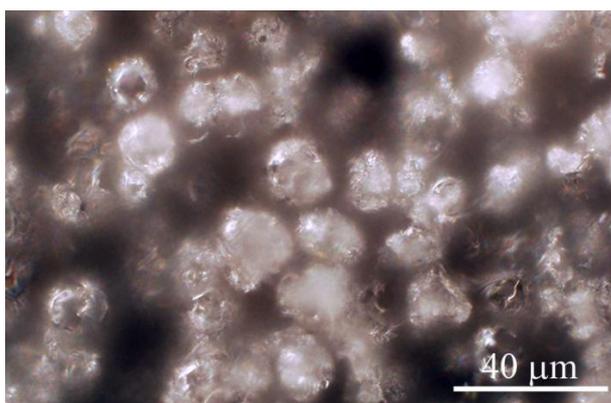
На первом этапе эксперимента время культивирования составляло 48 часов, на втором этапе – 14 суток при замене ППС каждые 3-4 дня, на третьем этапе - 21 сутки при замене ППС каждые 3-4 дня.

2.8.2. Трехмерная модель культивирования клеток

В соответствии с данными литературы в условиях трехмерного культивирования имеются существенные различия в морфофункциональной реакции клеток [Dellatore S.M. et al., 2008]. Трехмерная модель культивирования предполагает воссоздание условий активации клеток *in vitro*.

Для имитации трехмерной (3D) культуры в модели *in vitro* применяли образцы 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 размером 10x10x1 мм³ и несущих рельефное (индекс шероховатости Ra=2,0–3,0 мкм) микродуговое двустороннее КФ покрытие (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск) (рис. 11).

(А)



(Б)

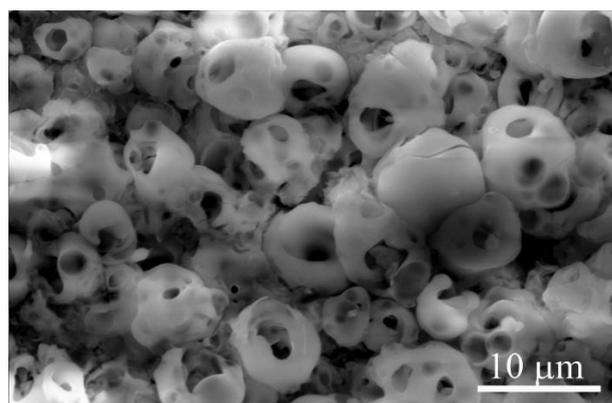


Рисунок 11. Изображения стандартной топографии кальций-фосфатного покрытия на подложке из титана (Ra = 2,0-2,9 мкм). (А) оптическое изображение, микроскопия в отраженном свете (темное поле) шкала 10 мкм,

увеличение $\times 1000$; (Б) электронно-микроскопическое изображение, шкала 40 мкм, увеличение $\times 2500$.

Покрытие формировали в анодном режиме при помощи 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 получали механохимическим способом, как описано [Chaikina M.V. et al., 2008]. Присутствие 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. Для получения покрытий со значениями Ra более 2 мкм, поверхность титановых подложек подвергали пескоструйной обработке порошком оксида алюминия Al₂O₃ с диаметром частиц 250–380 мкм.

Главными элементами в структуре КФ-покрытий являются сферолиты (диаметр до 20 мкм), формирующие скаффолд-подобный (толщиной до 75 мкм) слой и ямки между сферолитами (глубиной до 20 мкм и шириной до 50

мкм). Таким образом, максимальная высота профиля между сферолитами и углублениями (R_{max} по ГОСТ 2789–73) достигала 30–40 мкм. Сферолиты имеют внутренние полости, которые переходят 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.а и др., 2011]. Она содействует дифференцировке ССК в остеобласты, так как моделирует структурно-функциональное состояние минерального матрикса в фазу остеорезорбции, когда остеокласты образуют блюдцеобразные углубления в поверхности кости глубиной до 40 мкм и растворяют молекулы гидроксилапатита до нестехиометрических фосфатов кальция. Таким образом, мы рассматривали трехмерные образцы в качестве агентов, моделирующих состояние минерального вещества костной ткани при ее физиологическом ремоделировании. Титановые подложки с КФ покрытием, 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.

Структура рельефа кальций-фосфатного (КФ) покрытия (сферолиты и углубления) соответствуют таковой при физиологической регенерации костной ткани [Riggs B.L., Melton III L.J., 1995].

Перед тестированием биологической активности изготовленные образцы стерилизовали автоклавированием («BMG Labtech», Германия) при 121°C, 0,5 Атм. в течение 45 минут и сушили в сухожаровом шкафу (Sanyo, Япония) при 160°C в течение 1 ч.

Для сокультивирования ССК и ИК в присутствии трехмерного матрикса использовали модифицированную модель 3D-культивирования. Титановые матриксы помещали в лунки вертикально с одного края плоскодонных планшетов и крепили клипсой к стенке лунки. Далее на дно планшета высевали ССК, после прикрепления ССК и образования монослоя

добавляли суспензию ИК. Условия сокультивирования совпадали с таковыми при 2D-культивировании.

2.8.3. Экспериментальные модели культивирования для выявления остеогенной дифференцировки стромальных стволовых клеток

Для выявления направленной остеогенной дифференцировки в экспериментальных культурах (**2D модель, 2D-остео модель, 3D модель**), выделенные ССК 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 αMEM («Sigma-Aldrich», США), содержащей: 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США), 280 мг/л L-глутамина («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 остеоинтеграции объекта исследования и отрицательного контроля дифференцировки (культура ССК без добавления образцов для испытаний – **2D модель**) использовали ППС с описанным выше составом.

Сроки культивирования, используемые нами в исследовании, обусловлены предварительными экспериментальными работами и выявленными этапами клеточной жизнедеятельности в условиях *in vitro*.

Нами показано, что после контакта с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием, наиболее выраженный ответ иммунокомпетентных клеток в монокультуре регистрируется по истечении 48 ч, и характеризуется активацией клеток (экспрессия маркеров на мембране CD25, 28, 71, 95) пролиферацией (71), дифференцировкой (CD45RO/RA, гены дифференцировки).

В условиях *in vivo*, в среднем, через 12-15 суток завершается острая фаза воспаления, обусловленная функциональной активностью иммунокомпетентных клеток и активацией дифференцировки стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении в условиях межклеточных и межмолекулярных взаимодействий, поэтому нами был выбран срок культивирования 14 суток. Результаты описанных процессов можно детектировать по истечении 21 суток культивирования, в связи с этим, на 21 сутки культивирования была произведена окраска минерализатов межклеточного матрикса селективным красителем, подсчет суммарной очагов минерализации, определение количества клеток с морфологией кроветворных и уровень остеокальцина.

Таким образом, для оценки иммунного ответа был произведен комплексный анализ функциональной активности Т-клеток в различных условиях культивирования *in vitro* по истечении 48 часов культивирования. На 14 сутки культивирования оценивали особенности клеточного функционирования стромальных стволовых клеток на пластике и в присутствии трехмерного матрикса. Для изучения особенностей клеточного взаимодействия ССК с иммунокомпетентными клетками было проведено сокультивирование этих клеточных линий в разных условиях экспериментального исследования в соответствии с дизайном эксперимента. На 21 сутки культивирования были исследованы особенности дифференцировочного потенциала стромальных стволовых клеток в присутствии трехмерного искусственного матрикса.

2.9. Оценка морфофункционального состояния (активации, дифференцировки, созревания, пролиферации и гибели) клеточных культур в условиях 2D- и 3D-сокультивирования

Активацию клеточных культур изучали, основываясь на оценке морфологии клеток, изменения антигенного профиля клеточных мембран (CD детерминант), экспрессии генов дифференцировки и секреции цитокинов.

По истечении срока инкубации МНК аккуратно собирали пипеткой и переносили в эппендорфы, центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин. Затем аккуратно отбирали супернатант в чистые эппендорфы.

2.9.1 Определение антигенных детерминант

Принцип метода основан на детекции рассеивания света лазерного луча от единичных клеток выстроенных в потоке, а также на детекции флуоресценции флуорохромов, которые с помощью моноклональных антител, специфически связаны с антигенными детерминантами на клеточной поверхности, при прохождении клеток через оптическую систему проточного цитометра.

Иммунокомпетентные клетки

Иммунофенотипирование клеток проводили с применением коктейля моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD71, CD95, CD45, CD45RA, CD45RO («eBioscience», USA), приготовленного *ex tempore*. Анализ образцов клеточных суспензий был проведен на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия).

После культивирования образцы тщательно ресуспендировали. 50 мкл клеточной взвеси переносили в микроцентрифужные пробирки (типа эппендорф) и вносили 9 мкл коктейля моноклональных антител (pH=7,4). Суспензии клеток инкубировали в течение 30-45 мин в темном месте при температуре 4⁰С. По истечении времени инкубации в пробирки добавляли 200 мкл фосфатно-солевого буфера и центрифугировали течение 5 мин при комнатной температуре на скорости 1500 об/мин. После центрифугирования из пробирок аспирировали надосадочную жидкость и доводили общий объем клеточной пробы до 200 мкл посредством добавления фосфатно-солевого буфера. Далее производили тщательное ресуспендирование клеточных образцов автоматическим дозатором и переносили пробы в лунки иммунологического планшета. Анализ образцов клеточных суспензий производили на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия).

Результаты цитометрического анализа анализировали с использованием программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США).

Стромальные стволовые клетки

Для фенотипической идентификации культур ССК 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). Состав набора, методика окрашивания и тактика гейтирования описаны выше (разд. 2.7). Популяцию ССК 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 10).

2.9.2. Количественное определение медиаторов, секретируемых клетками

Количественное определение факторов роста, хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов проводили с использованием метода проточной флюориметрии на автоматизированном анализаторе (Bio-Plex 200 System, «Bio-Rad», США) с применением коммерческих тест-систем (Bio-Plex Pro Human cytokine Group I Assays, «Bio-Rad», США).

Метод основан на способности антител на поверхности магнитных гранул (микросфер) связываться с интересующими молекулами. Выраженность люминесценции антител пропорциональна количеству поглощённого света при действии лазера. Все микросферы в комплексе с антителом и исследуемой молекулой в камере анализатора Bio-Plex 200 System подвергаются воздействию двух лазеров с разной длиной волны. Флюорофоры испускают сигналы, которые регистрируются системой датчиков на приборе. В ходе анализа отмечают тип микросферы и присутствие (концентрация) искомого анализата на соответствующем типе частиц. Основные этапы анализа представлены на рисунке 12.

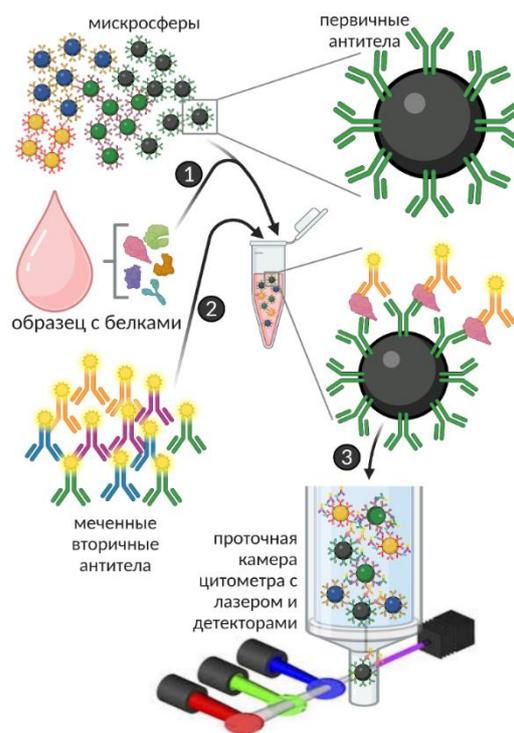


Рисунок 12. Основные этапы мультиплексного анализа: 1 – покрытые антителами микросферы добавляют к образцу белков, 2 – после инкубации добавляются вторичные меченные антитела, 3 – образец загружается в проточную камеру цитометра для считывания сигналов флуоресценции.

Анализ концентрации исследуемых нами медиаторов ($IFN\alpha$, $IFN\gamma$, IL-6, Eotaxin, $TNF\alpha$, RANTES, TRAIL, LIF, SCF, G-CSF, IL-4, IL-10, IL-13, IL-7), производили в супернатантах исследуемых культур, полученных при центрифугировании в следующих условиях: 500 об/мин в течение 10 минут (при 4 °C). Далее образцы обрабатывали в соответствии с протоколом фирмы-производителя тест-систем. На первом этапе работы в специализированные 96-луночные планшеты Bio-Plex вносили по 0,05 мл раствора микросфер. Затем микросферы 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 инструкцией фирмы-изготовителя. Для эффективного связывания всех компонентов

инкубацию проводили 30 минут в условиях полной темноты, при комнатной температуре и встряхивании 850 rpm. После инкубации планшет промывали трижды буфером (100 мкл), затем добавляли 25 мкл специфических антител. По истечению второй инкубации при 850 rpm при комнатной температуре образцы в планшете трижды отмывали и разбавляли в 50 мкл стрептавидина–PE. Связывание стрептавидина с биотинилированными антителами в пробах проходило в течение 10 минут в темном месте при встряхивании 850 rpm и комнатной температуре. После инкубации пробы отмывали три раза, разбавляли 125 мкл специальным буфером. На последнем этапе планшеты с пробами встряхивали в течение 30 секунд при 850 rpm 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.

Флюориметрический анализ показал отсутствие исследуемых цитокинов в исходной среде для культивирования клеток.

2.10. Оценка дифференцировки и созревания клеток

2.10.1. Определение относительного уровня экспрессии мРНК исследуемых генов

Анализ относительного уровня экспрессии мРНК генов, ассоциированных с дифференцировкой (*U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*)

иммунокомпетентных клеток и с дифференцировкой и созреванием ССК в остеогенном направлении (*BMP2*, *BMP6*, *RUNX2*, *FGF10*, *RUNX2*, *SMURF1*, *TBX5*, *ALP*) был произведен с использованием метода полимеразной цепной реакции.

По истечении времени культивирования (48 часов для ИК, 14 суток для ССК и смешанных культур), клеточные культуры осаждали центрифугированием 5 минут на скорости 2000 об/мин.

Выделение тотальной РНК из полученных образцов проводили с использованием реагента ExtractRNAkit («Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. В клеточные суспензии добавляли реагент ExtractRNA («Евроген», Россия) для лизиса клеток и инкубировали полученную смесь в течение 15 минут с последующим центрифугированием в течение 10 минут на скорости 15000g («Eppendorf», Centrifuge 5804R, Германия). Надосадочную жидкость с РНК снимали и переносили в новую стерильную пробирку с добавлением 200 мкл хлороформа («Вектон», Россия). Смесь инкубировали в течение 5 минут, встряхивая образец по 15 секунд раз в минуту. Далее РНК-смесь центрифугировали при 4°C 15000g в течение 15 минут.

Затем РНК очищали методом спиртового осаждения: сначала путем добавления 100% изопропанола с последующим инкубированием (10 минут) и центрифугированием на скорости 12000g (10 минут) при комнатной температуре. После добавлялся 75% этанол и образец 5 минут центрифугировали на 15000g при комнатной температуре. Этанол удаляли и остатки спирта высушивали на воздухе в течение 5 минут и добавляли 30 мкл воды свободной от РНКаз и ДНКаз. Чистота РНК была проверена на спектрофотометре (Nanovue Plus, «GE Healthcare» Bio-Sciences, Швеция). Качество РНК идентифицировали методом гель-электрофореза по соотношению плотности бэндов 28S/18S рибосомальных субъединиц.

Концентрация тотальной РНК измерялась на приборе Implen NanoPhotometer N («Implen», Германия). Далее с помощью свободной от РНКаз и ДНКаз воды, исследуемые образцы тотальной РНК доводили до одинаковой концентрации (10 мкг/мл). Для осуществления реакции обратной транскрипции для каждого образца была приготовлена реакционная смесь, содержащая РНК матрицу (9 мкл) и праймер oligo(dT)23-primer (4,5 мкл) («Beagle», Россия). 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.

Затем проводили реакцию обратной транскрипции выделенной тотальной РНК с применением праймера oligo(dT)23-primer (20 мкМ) («Beagle», Россия) и обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия).

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 инкубировали 1 час при температуре 42°C, и затем 10 минут на 70°C для инактивации ферментов.

ПЦР проводили в трех повторах с использованием реагента qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфических гидролитических флуоресцентных зондов и праймеров в концентрации 10пМ («Beagle», Россия) в амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген RPLP0.

Оптимизацию условий ПЦР проводили амплификацией пяти последовательных 10-ти кратных разведений кДНК с двумя повторами для расчета фактической эффективности праймеров. Подбор оптимальной температуры для каждой пары праймеров проводили, используя градиентную ПЦР на том же амплификаторе (CFX96 «BioRad», США).

Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов, которые были использованы в эксперименте, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте

Название гена	Последовательность
<i>RPLPO</i>	F: 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAАCT-3'
	R: 5'-CCATCAGCACCCACAGCCTTC-3'
	Probe: Bgl635-5'- ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'- BHQ-2
<i>GFII</i>	F: 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'
	R: 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'
	Probe: FAM-5'- CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA- 3'~BHQ-1
<i>U2af114</i>	F: 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3'
	R: 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3'
	Probe: FAM-5'- CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA- 3'~BHQ-1

<i>hnRPLL</i>	F: 5'- CTCTCAATTCAGAATCCGCTTTATC-3'
	R: 5'- CCATTGCTTGTATCCCATTCTC-3'
	Probe: FAM-5'- TATGCAACCCTGTTGGCAAAGTGC- 3'~BHQ-1
<i>Homo sapiens runt-related transcription factor 2 (RUNX2)</i>	F:5'- CCAGAAGGCACAGACAGAAG-3'
	R: 5'- GATGAGGAATGCGCCCTAAA-3'
	Probe: 5'- FAM- AGTTTGTCTCTGACCGCCTCAGT-- BHQ1-3'
<i>Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2)</i>	F:5'-ACGAGGTCCTGAGCGAGTT-3'
	R: 5'-GACCTGAGTGCCTGCGATAC-3'
	Probe: 5'- FAM- CTGAAACAGAGACCCACCCCCAGCA- BHQ1-3'
<i>Homo sapiens bone morphogenetic protein 6 (BMP6)</i>	F:5'- TTACAGGAGCATCAGCACAG-3'
	R: 5'- GGAGTCACAACCCACAGATT-3'
	Probe: 5'- FAM- CCTCAGAAGAAGGCTGGCTGGAAT- BHQ1 -3'
<i>Homo sapiens bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein</i>	F: 5'- GAGGGTATAAACAGTGCTGGAG- 3'

<i>(BGLAP) или osteocalcin (BGP)</i>	R: 5'- AATAGGGCGAGGAGTGTGA-3'
	Probe: 5'-FAM-CAGCCACCGAGACACCATGAGA-BHQ1-3'
<i>Homo sapiens alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL)</i>	F:5'-GGGAAATCTGTGGGCATTGT-3'
	R: 5'-GAGTACCAGTCCCGGTCAGC-3'
	Probe: 5'- FAM-ACCACGAGAGTGAACCATGCCA-BHQ1-3'
<i>Homo sapiens TATA box binding protein (TBP)</i>	F: 5' - TCTTGGCGTGTGAAGATAACC-3'
	R: 5' - GCTGGAACTCGTCTCACTATTC-3'
	Probe: 5'- FAM-AGTTGCTGAGAAGAGTGTGCTGGA-BHQ1 -3'
<i>Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)</i>	F: 5' - TGGCGTCGTGATTAGTGATG-3'
	R: 5' - GACG TTCAGTCCTGTCCATAAT-3'
	Probe: 5'- FAM-TGCTGAGGATTTGGAAAGGGTGTT-BHQ1-3'
<i>Homo sapiens ubiquitin C (UBC)</i>	F: 5'- CATAAGACTCGGCCTTAGAACC-3'
	R: 5'- GTTCCGCTCTCTGGAAAGAA -3'
	Probe: 5'-FAM-

	TTAGGACGGGACTTGGGTGACTCT - BHQ1-3'
<i>Homo sapiens fibroblast growth factor 10 (FGF10)</i>	F: 5'- GATTGAGAAGAACGGGAAGGT-3'
	R: 5'- GCTTTGACGGCAACAACCTC -3'
	Probe: 5'- FAM- CAGCGGGACCAAGAAGGAGAACTG- BHQ1-3'
<i>Homo sapiens T-box 5 (TBX5)</i>	F: 5'- ATCATAACCAAGGCTGGAAGG-3'
	R: 5'- CAGGTACAATGTCCATGAGAAGA- 3'
	Probe: 5'- FAM- AGTTACAAAGTGAAGGTGACGGGC- BHQ1-3'
<i>Homo sapiens SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 (SMURF1)</i>	F: 5'- CCACCCATATATCCCTCCTTTAC-3'
	R: 5'-CTGTGTGACCAAAGCCAAAG-3'
	Probe: 5'-FAM- ACCCACTTCCATCACCCATCCAAT- BHQ1-3'

Результат ПЦР анализа был рассчитан методом максимума второй производной (Second Derivative Maximum method), с помощью модифицированной формулы Пфаффа [Pfaffl M.W., Hageleit M.].

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

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

2.10.2. Оценка суммарной площади очагов минерализации и содержания клеток с морфологией кроветворных в разных экспериментальных культурах методом компьютерной морфометрии

Идентификацию участков минерализации в культурах ССК с образцами проводили через 21 сутки методом окрашивания с использованием красителя 2% водного раствора ализаринового красного («Sigma-Aldrich», США), по стандартной методике (см. п. 2.6).

Для получения микрофотографий окрашенных культур использовали лабораторный микроскоп IX 51 S8F для биологических работ с использованием методов фазового контраста, флуоресценции и возможность документирования 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 было проведено с применением инструментов компьютерной программы Adobe Photoshop CS6 («Adobe Inc.», США) в соответствии с алгоритмом, представленному в руководствах [Новицкий В.В., Шахов В.П., Хлусов И.А., 2004; Автандилов Г.Г., 2006].

Очаги минерализации были определены с применением инструмента «Волшебная палочка». Для каждого центра минерализации индивидуально

был подобран допуск инструмента на основании цветовой характеристики минерализата (рисунок 14).

После проведения измерений, площадь каждого трехмерного очага/узелка минерализата заносили в таблицу, а его границы окрашивали в зеленый/лиловый цвет, для визуализации обведённых участков. В связи с тем, что съемку производили на объективах с различным увеличением, нами были введены поправочные коэффициенты для пересчета площади из пикселей в квадратные микрометры. Результаты оценки 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) (рис. 13, 14).

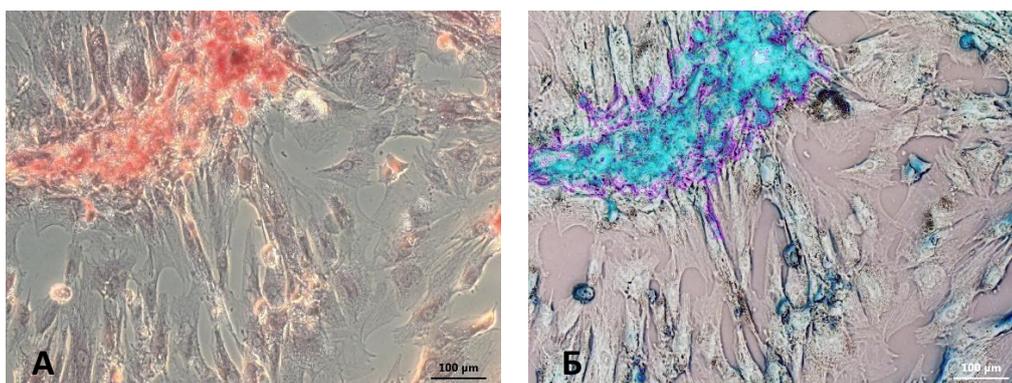


Рисунок 13. Фотографии 3D-культур стромальных стволовых клеток человека по истечении 21 суток культивирования после окраски участков минерализации межклеточного вещества ализариновым красным: (а) - нативная микрофотография, (б) инверсированная микрофотография, лиловой линией обведены участки минерализатов. Шкала 100 мкм

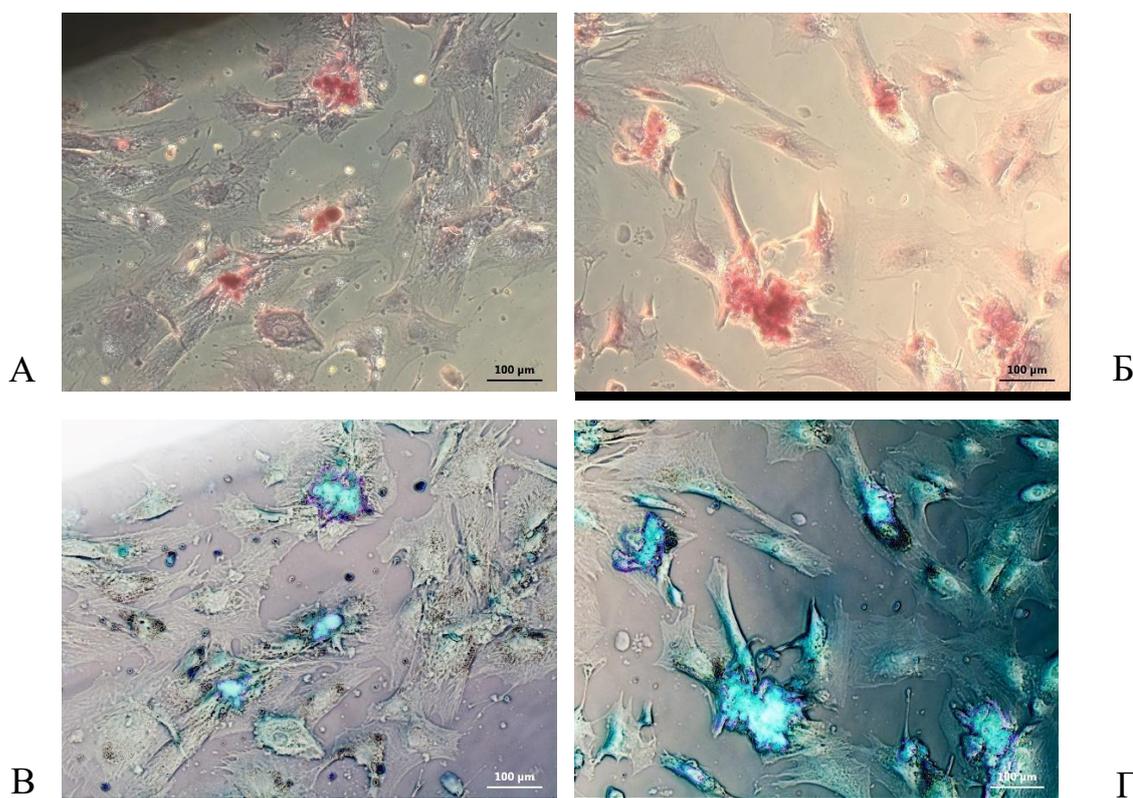


Рисунок 14. Фотографии 3D-культур стромальных стволовых клеток человека по истечении 21 суток культивирования после окраски участков минерализации межклеточного вещества ализариновым красным: (а) - нативная микрофотография, (б) инверсированная микрофотография, лиловой линией обведены участки минерализатов. На фото визуализированы клетки с морфологией кроветворных (размер 7-15 мкм, округлой формы, наличие ядра). Шкала 100 мкм.

2.10.3. Определение уровня остеокальцина в супернатантах разных экспериментальных культур методом иммуноферментного анализа

О направлении созревания ССК судили по секреции остеокальцина (ОК). ОК, наряду с щелочной фосфатазой, считаются реальными молекулярными маркерами дифференцировки ССК в функционально зрелые секретирующие остеобласты. Увеличение концентрации CrossLaps

свидетельствует в пользу остеокластоподобной функции клеток [Riggs B.L., Melton III L.J., 1995]

Количественное определение содержания остеокальцина, маркера функциональной активности остеобластов, в супернатантах 21-дневных клеточных культур ССК проводили методом иммуноферментного анализа, с использованием коммерческого набора N-MID Osteocalcin ELISA. Для определения уровня метаболитов клеточные супернатанты собирали на 21 сутки и центрифугировали в течение 10 мин при 500g, применяли стандартную схему иммуноферментного анализа согласно протоколу фирмы-изготовителя (Osteometer Bio TechA/SN-MID Osteocalcin One Step ELISA test system; «Nordic bioscience diagnostics», Дания).

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 протоколом фирмы-производителя и дизайном исследования, в соответствующие лунки планшета вносили по 20 мкл стандартных образцов, контрольных образцов и образцов супернатанта клеточных культур ССК, 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 на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа «Лазурит» («DynexTechnologies», США). Оценка оптической плотности осуществлялась при длине волны 450 нм с референсной длиной волны - 650 нм. Результаты выражали в нг/мл.

2.11. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: медиану (M), первый и третий квартили (Q1, Q3). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический критерий для зависимых выборок Вилкоксона и критерий для независимых выборок Манна-Уитни. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r)) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии – r^2) анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (Кремер Н.Ш., 2004).

Схема дизайна исследования представлена на рисунке 15 и в таблицах 3 и 4.

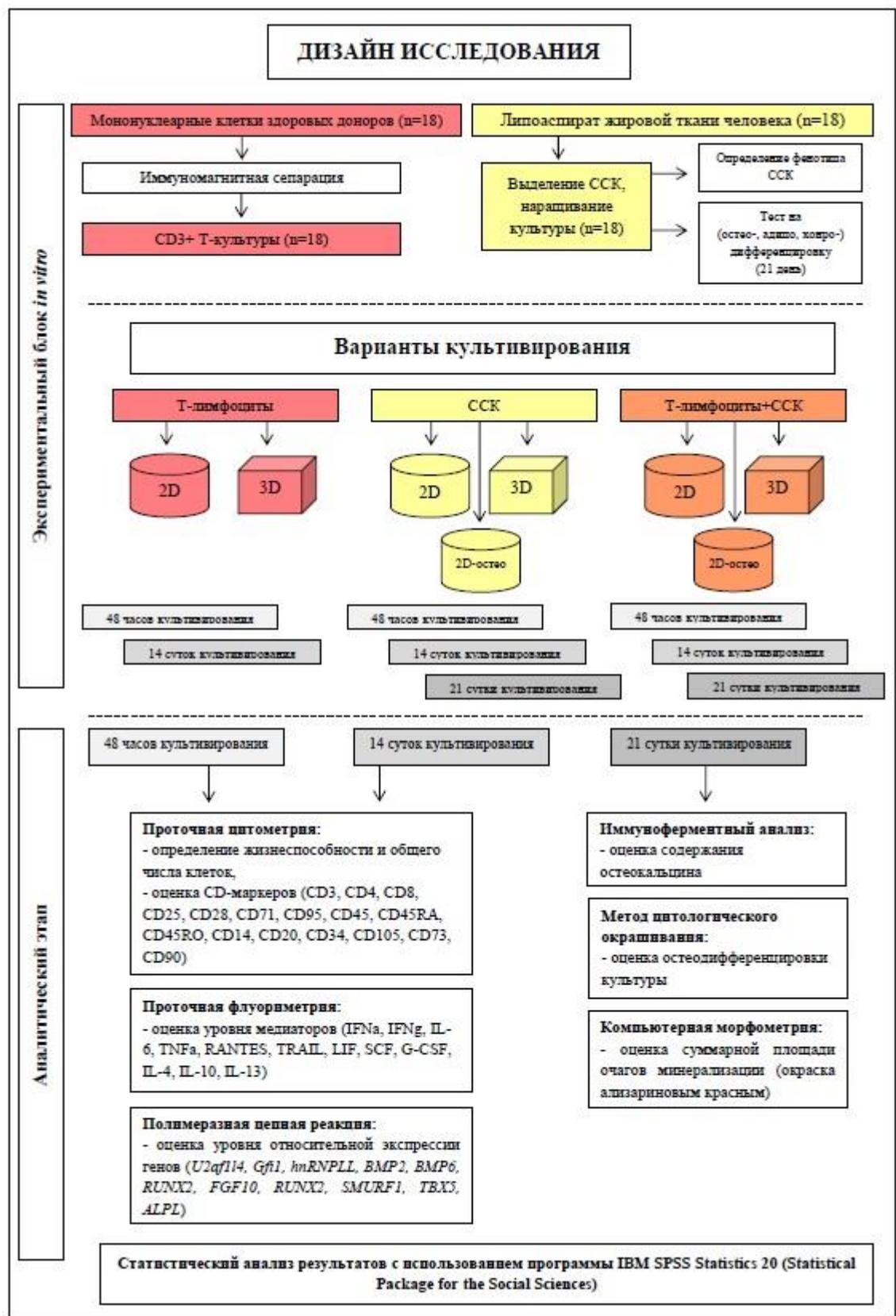


Таблица 3. Распределение разных экспериментальных клеточных моделей *in vitro* в соответствии с использованными методами исследования (число культур, полученных от доноров / число проб, измерений, n/p/c)

Методы исследования		Условия культивирования					
		2D			3D		
		ИК	ССК	ИК+ССК	ИК	ССК	ИК+ССК
		48 ч/ 14 сут	14 /21 сут	14 /21 сут	48 ч/ 14 сут	14 /21 сут	14 /21 сут
Проточная флуориметрия	Определение жизнеспособности и общего числа клеток, n/p	18 / 56	18 / 56	18 / 56	18 / 56	18 / 56	18 / 56
	Определение CD-маркеров CD3 ⁺ CD4 ⁺ ; CD3 ⁺ CD8 ⁺ ; CD3 ⁺ CD25 ⁺ ; CD3 ⁺ CD28 ⁺ ; CD3 ⁺ CD71 ⁺ ; CD3 ⁺ CD95 ⁺ CD3 ⁺ CD45RA ⁺ CD45R0 ⁺ , n/p/c	18 / 56 / 504	-	18 / 56 / 504	18 / 56 / 504	-	18 / 56 / 504
	[CD45, CD34, CD14, CD20,] ⁺ CD105 ⁺ ; CD73 ⁺ ; CD90 ⁺ n/p/c	-	18 / 56 / 280	18 / 56 / 280	-	18 / 56 / 280	18 / 56 / 280
	Оценка уровня медиаторов (IFN γ , IL-2, IL-6, TNF α , RANTES, TRAIL, LIF, SCF, G-CSF, Eotaxin, IL-7, IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15) n/p/c	18/56/ 56	18 / 56 / 56	18 / 56 / 56	18/56/ 56	18/56 / 56	18/56 / 56
Полимеразная цепная реакция	Оценка уровня относительной экспрессии генов (<i>RPLPO</i> , <i>U2af114</i> , <i>Gfi1</i> , <i>hnRNPLL</i>) n/p/c	18 / 56 / 224	-	18 / 56 / 224	18 / 56 / 224	-	18 / 56 / 224
	Оценка уровня относительной экспрессии генов (<i>RPLPO</i> , <i>BMP2</i> , <i>BMP6</i> , <i>BGLAP</i> , <i>ALPL</i> , <i>TBP</i> , <i>HPRT</i> , <i>UBC</i> , <i>FGF10</i> , <i>RUNX2</i> , <i>SMURF1</i> , <i>TBX5</i>) n/p/c	-	18 / 56 / 672	18 / 56 / 672	-	18 / 56 / 672	18 / 56 / 672

Примечание (здесь и в табл. 4): n - число культур, полученных от доноров, p – число проб, измерений, c – число измерений.

Таблица 4. Распределение экспериментальных клеточных моделей стромальных стволовых клеток и смешанных культур *in vitro* в соответствии с использованными методами исследования (число культур, полученных от доноров / число проб, измерений, п/р/с)

Методы исследования		Условия культивирования				
		2D			3D	
		ССК	2D- модель_ остео	ИК+ССК	ССК	ИК+ССК
Иммуноферментный анализ	Оценка содержания остеокальцина, п/р/с	18/56/56	18/56/56	18/56/56	18/56/56	18/56/56
	Оценка числа клеток с морфологией кроветворных, п/р/с	18/56/180	18/56 /200	18/56/200	18/56/180	18/56/150
Методы цитологического окрашивания с применением комп. морфометрии	Оценка суммарной площади очагов минерализации (окраска ализариновым красным), п/р/с	18/56/180	18/56 /200	18/56/200	18/56/180	18/56/150

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Количественное определение относительного (%) содержания жизнеспособных, апоптотических и мертвых форм клеток в разных экспериментальных культурах в условиях *in vitro* в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием

В соответствии с данными, полученными в ходе проведенного эксперимента, было выявлено, что в двухмерной модели культивирования абсолютное количество Т-клеток составило $2,97 (2,89 - 3,05) \times 10^5$ клеток/мл. В культуре с добавлением 3D-матрикса абсолютное количество клеток было на уровне контрольных 2D культур и составило $2,55 (2,36 - 2,89) \times 10^5$ клеток/мл.

Оценка относительного содержания живых клеток в 2D-культуре составило 89,96 (85,71 – 94,15)%, в трехмерной культуре процентное содержание живых клеток статистически значимо снижалось ($p < 0,05$) (таблица 5).

На фоне снижения относительного содержания живых клеток в 3D-культурах наблюдалось увеличение апоптотических и мертвых форм иммунокомпетентных клеток крови, процентное соотношение которых составило 2,50 (2,41 – 3,98)% и 24,35 (20,56 – 29,72)% соответственно. Полученные показатели клеточной смерти статистически достоверно отличались от таковых в контрольной культуре на пластике (содержание апоптотических в двухмерной культуре форм было равно 1,80 (1,25 – 2,05)%, мертвых - 8,67 (3,81 – 13,04)%) ($p < 0,05$).

В смешанных 2D- и 3D- моделях культивирования (по истечении 14 суток) число жизнеспособных, апоптотических и мертвых форм клеток соответствовало значениям, полученным при культивировании Т-клеток в течение 48 часов.

Таблица 5. Относительное (%) содержание жизнеспособных, апоптотических и мертвых форм неприлипающих иммунокомпетентных клеток крови человека в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования – 48 часов), Me (Q₁ – Q₃), n=18

Показатели	2D-монокультура ИК n=18	3D- монокультура ИК n=18
Число живых клеток, %	89,96 (85,71 – 94,15)	73,15 (67,87 – 75,46) p<0,05
Число апоптотических клеток, %	1,80 (1,25 – 2,05)	2,50 (2,41 – 3,98) p<0,05
Количество мертвых, % клеток	8,67 (3,81 – 13,04)	24,35 (20,56 – 29,72) p<0,05

Примечание: p – достоверные различия с 2D-культурой иммунокомпетентных клеток, согласно U критерию Манна-Уитни.

Согласно данным, представленным в таблице 6, число жизнеспособных ССК по истечении 14 суток культивирования в 2D-культуре составило 93,40 (90,96 – 95,04)%, в 3D культуре число живых клеток оставалось на том же уровне (таблица 6).

При оценке процентного содержания апоптотических клеток было выявлено, что в контрольной 2D-культуре число клеток составило 1,49 (0,87 – 2,71)%, тогда как в 3D-культуре их количество было равно 3,24 (1,48 – 4,23)% (p<0,05). Число мертвых форм ССК было сопоставимо в двумерной и

трехмерной культурах и составило 5,11 (4,09 – 6,33)% и 4,31 (3,68 – 7,02)% соответственно. В смешанных 2D- и 3D- моделях культивирования число жизнеспособных, апоптотических, мертвых форм ССК соответствовало значениям, полученным при культивировании монокультур ССК. Было выявлено, что в смешанной 3D-модели количество апоптотических клеток статистически значимо повышалось по сравнению со значениями, полученными при оценке смешанной 2D-культуры.

Таблица 6. Абсолютное ($\times 10^5$ клеток/мл) и относительное (%) содержание жизнеспособных, апоптотических и мертвых форм стромальных стволовых клеток в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования - 14 дней), Me (Q₁ - Q₃)

Исследуемые показатели	2D монокультура ССК n=18	3D монокультура ССК n=18	Смешанная 2D-культура клеток ССК + ИК n=18	Смешанная 3D-культура клеток ССК + ИК n=18
	1	2	3	4
Число живых клеток, %	93,40 (90,96 – 95,04)	92,45 (88,75 – 94,84)	93,77 (92,51 – 94,97)	93,02 (88,67,35 – 95,32)
Число апоптотических клеток, %	1,49 (0,87 – 2,71)	3,24 (1,48 – 4,23) p ₁ <0,05	1,34 (0,77 – 2,01)	3,31 (1,51 – 3,46) p ₂ <0,05
Количество мертвых клеток, %	5,11 (4,09 – 6,33)	4,31 (3,68 – 7,02)	4,89 (4,26 – 5,48)	3,71 (3,17 – 7,87)

Примечание: p₁ – достоверные различия с 2D-культурой стромальных стволовых клеток, p₂ – достоверные различия со смешанной 2D-культурой стромальных стволовых клеток+иммунокомпетентных клеток, согласно U критерию Манна-Уитни.

3.2. Оценка молекул дифференцировки на клеточной поверхности в разных экспериментальных культурах клеток в условиях *in vitro* в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием

По истечении 48 часов культивирования в двумерной культуре Т-клеток на пластике было выявлено 66,83 (64,38 – 69,11)% CD4⁺ лимфоцитов и 33,17 (30,89 – 35,62)% CD8⁺ клеток. В трехмерной культуре иммунокомпетентных клеток, представленной Т-лимфоцитами, содержание CD4⁺ и CD8⁺ клеток статистически достоверно не изменялось ($p > 0,05$).

Исследование презентации на поверхностной мембране Т-лимфоцитов маркера костимуляции показало, что в 2D-модели культивирования число CD4⁺ CD28⁺ было равным 75,26 (74,13 – 77,82)%, тогда как в трехмерной модели культивирования количество клеток, экспрессирующих маркер костимуляции статистически значимо не изменялось и составило 74,42 (73,18 – 76,21)%.

В популяции цитотоксических лимфоцитов по истечению 48 часов культивирования на пластике молекулу CD28 несли на своей поверхности 78,65 (77,51 – 80,06)%, тогда как в 3D модели культивирования отмечалось статистически достоверное изменение количества CD8⁺CD28⁺, процентное соотношение которых составило 78,54 (76,23 – 79,76) (таблица 7).

Анализ экспрессии маркера ранней активации CD25⁺ показал, что в популяции Т-хелперов количество клеток, презентующих на своей поверхности молекулу CD25⁺ в культуре на пластике составило 6,54 (5,93 – 7,19)%, тогда как в трехмерной культуре число CD4⁺ CD25⁺ клеток статистически достоверно не изменялось. В субпопуляции цитотоксических клеток, количество CD8⁺ лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25⁺, в двумерной культуре составило 0,31 (0,24 – 0,56)%, тогда как в присутствии трехмерного матрикса количество CD8⁺CD25⁺ возрастало до 0,42 (0,27 – 0,68)% ($p < 0,05$) (таблица 7).

В исследуемых популяциях иммунокомпетентных клеток также был детектирован маркер пролиферации CD71⁺. Поверхностная экспрессия CD71⁺ в субпопуляции CD4⁺-хелперов отмечалась у 3,42 (2,56 – 5,39)% клеток в 2D-модели и статистически значимо увеличивалось в трехмерной культуре при сокультивировании с трехмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань до 5,31 (4,28 – 6,91)% (p<0,05).

В субпопуляции цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов количество клеток, экспрессирующих молекулу пролиферации CD71⁺ в двумерной модели культивирования составило 1,34 (0,79 – 1,87)%, тогда как количество CD8⁺CD71⁺ клеток в 3D-модели достоверно повышалось и было равным 2,12 (1,65 – 2,49)% (p<0,05).

Исследование клеток, экспрессирующих молекулу поздней активации и апоптоза позволило выявить статистически значимое снижение числа CD4⁺ клеток, экспрессирующих маркер CD95⁺ в трехмерной модели культивирования (9,18 (8,43 – 10,29)%, в сравнении с исследуемым показателем в двумерной клеточной модели культивирования (10,61 (10,13 – 11,75)%) (p<0,05). Аналогичная тенденция отмечалась в субпопуляции цитотоксических лимфоцитов. Так, число CD8⁺ CD95⁺ клеток в двумерной модели культивирования составило 1,61 (1,04 – 1,86)%, тогда как в присутствии трехмерного матрикса количество CD8⁺ лимфоцитов, несущих на своей поверхности маркер поздней активации и апоптоза, составило 1,24 (0,92 – 1,61)% (p<0,05).

Оценка дифференцировочного потенциала T-лимфоцитов показала, что в двумерной модели культивирования количество CD3⁺ клеток, экспрессирующих высокомолекулярную изоформу CD45RA⁺, составило 66,47 (59,57 – 68,53)%, в трехмерной культуре число CD3⁺ CD45RA⁺ было равно 64,75 (57,62 – 66,68)% (p<0,05). Число T-лимфоцитов, презентующих низкомолекулярную изоформу CD45R0⁺ в двумерной модели культивирования составило 36,34 (33,54 – 37,04)%, тогда как в

трехмерной культуре клеток количество CD3⁺ CD45R0⁺ статистически значимо увеличивалось и было равно 39,36 (36,21 – 41,54) (p<0,05).

Таблица 7. Оценка мембранной экспрессии молекул клеточной дифференцировки в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования – 48 часов), Ме (Q₁ – Q₃)

Исследуемые показатели	2D-культура ИК n=18	3D-культура ИК n=18
CD3 ⁺ CD8 ⁺	33,17 (30,89 – 35,62)	34,21 (32,43 – 36,19)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	66,83 (64,38 – 69,11)	65,82 (63,81 – 67,57)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺	0,31 (0,24 – 0,56)	0,42 (0,27 – 0,68) p< 0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	6,54 (5,93 – 7,19)	6,18 (5,74 – 6,92)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD71 ⁺	1,34 (0,79 – 1,87)	2,12 (1,65 – 2,49) p< 0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD71 ⁺	3,42 (2,56 – 5,39)	5,31 (4,28 – 6,91) p< 0,05

CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁺	78,65 (77,51 – 80,06)	78,54 (76,23 – 79,76)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD28 ⁺	75,26 (74,13 – 77,82)	74,42 (73,18 – 76,21)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD95 ⁺	1,61 (1,04 – 1,86)	1,24 (0,92 – 1,61) p< 0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD95 ⁺	10,61 (10,13 – 11,75)	9,18 (8,43 – 10,29) p< 0,05
CD3 ⁺ CD45RA ⁺	66,47 (59,57 – 68,53)	64,75 (57,62 – 66,68) p< 0,05
CD3 ⁺ CD45R0 ⁺	36,34 (33,54 – 37,04)	39,36 (36,21 – 41,54) p< 0,05
CD3 ⁺ CD45RO ⁺ CD4 5RA ⁺	42,56 (39,12 – 45,96)	45,89 (41,19 – 56,24) p< 0,05

Примечание: p₁ – достоверные различия с 2D-культурой иммунокомпетентных клеток, согласно U критерию Манна-Уитни.

В смешанной модели культивирования по истечении 14 суток культивирования анализ количества клеток, несущих на своей поверхности маркеры ранней (CD25⁺, CD71⁺) и длительной (CD95⁺) активации показал увеличение клеток в смешанных 2D- и 3D-культурах по сравнению с

данными, полученными при оценке краткосрочного (48 часов) культивирования монокультур иммунокомпетентных клеток (табл. 7, 8). Важно отметить, что присутствие трехмерных матриц в смешанной культуре ССК+ИК статистически значимо увеличивало число клеток с фенотипом CD3⁺CD95⁺ по истечении 14 суток культивирования (табл. 8).

Также было выявлено увеличение Т-клеток памяти с фенотипом CD3⁺CD45RO⁺ и переходных форм CD3⁺CD45RO⁺CD45RA⁺, которое отмечалось за счет реэкспрессии длинной изоформы CD45 – CD45RA⁺ (табл. 8).

Таблица 8. Оценка мембранной экспрессии молекул клеточной дифференцировки в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования – 14 суток), Ме (Q₁ – Q₃)

Исследуемые показатели	2D-культура клеток ИК n=18	3D-культура клеток ИК n=18	Смешанная 2D-культура клеток ССК + ИК n=18	Смешанная 3D-культура клеток ССК + ИК n=18
	1	2	3	4
CD3 ⁺ CD8 ⁺	34,11 (28,77-35,24)	35,59 (34,11-37,74)	31,76 (23,59-34,88) p ₂ < 0,05	24,13 (21,74-27,82) p _{1,2,3} < 0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺	65,98 (64,76-71,23)	64,41 (62,26-65,89)	68,24 (65,12-76,41)	75,87 (72,18-78,26) p _{1,2} < 0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺	86,12 (83,65-	91,63 (86,72-	66,32 (62,56-69,37)	67,44 (64,28-69,18)

	89,34)	95,89)	p1,2 < 0,05	p1,2 < 0,05
CD3 ⁺ CD71 ⁺	67,91 (66,43- 73,21)	75,87 (73,54- 77,34) p1 < 0,05	26,31 (20,67-31,24) p1,2 < 0,05	27,57 (22,54-33,01) p1,2 < 0,05
CD3 ⁺ CD95 ⁺	40,64 (37,32- 44,53)	37,56 (35,07- 39,42) p1 < 0,05	60,85 (45,31-68,76) p1,2 < 0,05	62,74 (55,53-66,32) p1,2 < 0,05
CD3 ⁺ CD45RO ⁺ CD45 RA ⁺	65,14 (63,41- 72,56)	71,53 (66,98-79,48) p1 < 0,05	91,34 (87,49-94,67) p1,2 < 0,05	92,79 (90,64-93,05) p1,2 < 0,05
CD3 ⁺ CD45RA ⁺	92,35 (88,64- 95,38)	86,23 (79,16- 91,65) p1 < 0,05	97,63 (93,61-98,38) p1,2 < 0,05	93,41 (91,87-94,59) p2,3 < 0,05
CD3 ⁺ CD45RO ⁺	78,64 (72,43- 82,65)	79,36 (71,75- 84,56)	91,16 (89,45-93,66) p1,2 < 0,05	92,46 (90,71-94,37) p1,2 < 0,05

Примечание: p₁ – достоверные различия с 2D-культурой иммунокомпетентных клеток, p₂ – достоверные различия с 3D-культурой иммунокомпетентных клеток, p₃ – достоверные различия со смешанной 2D-культурой стромальных стволовых клеток+ иммунокомпетентных клеток, согласно U критерию Манна-Уитни.

По истечении времени культивирования в культуре ССК было выявлено достоверное увеличение числа клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток CD (45⁺,34⁺,14⁺,20⁺) (табл. 9).

В трехмерной модели культивирования отмечалось снижение числа клеток, несущих на своей поверхности маркер CD105⁺ по окончании времени культивирования до 95,33 (93,6 - 97,74)% по сравнению со значениями, полученными в 2D-модели (98,91 (98,76 - 99,1)%). Содержание CD90⁺ клеток по истечении времени культивирования также было статистически значимо снижено в экспериментальной 3D-культуре 95,14 (92,83 - 97,31)%, по сравнению с 2D-моделью (98,7 (98,33 - 98,84)%) (табл. 9).

Количество CD73⁺ клеток по окончании времени культивирования в двумерной и трехмерной культурах было сопоставимо и составило 95,73 (93,53 - 96,16)% и 92,32 (85,71 - 93,73)% соответственно (табл. 9).

В смешанной модели культивирования (ССК+ИК), как в присутствии трехмерных образцов, имитирующих регенерирующую костную ткань, так и без них, отмечалось достоверное увеличение процентного содержания клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток CD (45⁺,34⁺,14⁺,20⁺) до 10,40 (8,62 - 10,86)% и 11,40 (7,16 - 12,39) % соответственно (табл. 9).

В смешанной модели культивирования отмечалось статистически значимое снижение всех классических маркеров ССК – CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, как в присутствии трехмерных матриц, так и без них при сравнении значений, полученных при оценке монокультур ССК (табл. 9).

Таблица 9. Иммунофенотип (%) стромальных стволовых клеток в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования – 14 суток), Ме (Q1 - Q3), n=18

Исследуемые показатели	2D культура клеток ССК	3D культура клеток ССК	2D культура клеток ССК+ИК	3D культура клеток ССК+ИК
	1	2	3	4
Гемопоэтические детерминанты				
CD45⁺,34⁺,14⁺,20⁺	0,33 (0,235 - 0,365)	0,69 (0,63 - 0,97) p1< 0,05	11,40 (7,16-12,39) p1,2< 0,05	10,40 (8,62-10,86) p1,2< 0,05
Маркеры стромальных стволовых клеток				
CD73⁺	95,73 (93,53 - 96,16)	92,32 (85,71 - 93,73) p1<0,05	93,33 (89,63-95,76)	88,49 (83,88-89,01) p1,2,3<0,05
CD105⁺	98,91 (98,76 - 99,1)	95,33 (93,6 - 97,74) p1<0,05	90,83 (84,72-92,29) p1,2 <0,05	88,52 (82,49-88,92) p1,2< 0,05
CD90⁺	98,7 (98,33 - 98,84)	95,14 (92,83 - 97,31) p1<0,05	78,96 (78,30-84,22) p1,2< 0,05	77,73 (70,80-78,73) p1,2< 0,05

Примечание: p₁ – достоверные различия с 2D-культурой стромальных стволовых клеток, p₂ – достоверные различия с 3D-культурой стромальных стволовых клеток, p₃ – достоверные различия со смешанной 2D-культурой стромальных стволовых клеток + иммунокомпетентных клеток, согласно U критерию Манна-Уитни.

3.3. Анализ продукции медиаторов (хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов, факторов роста) в разных экспериментальных культурах клеток в условиях *in vitro* в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием

По окончании времени культивирования (48 часов) наблюдалось увеличение продукции исследуемых провоспалительных цитокинов и хемокинов при культивировании с трёхмерным матриксом.

Так, уровень IFN γ в трёхмерной модели культивирования был равен 378,82 (300,54 - 508,81) пг/мл, что превышало показатели, полученные при оценке 2D-контрольных значений (292,34 (233,17 - 312,06)) пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 10).

Продукция TNF α в 2D-модели культивирования составила 104,35 (76,83 - 110,01) пг/мл, в 3D-культуре концентрация цитокина была выше более чем в 1,5 раза - 162,65 (95,32 - 282,42) пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 10).

Концентрация IL-2 в среде культивирования на момент окончания культивирования в 2D-культуре составила 19,32 (13,41 - 44,29) пг/мл, тогда как в трёхмерной культуре уровень IL-2 составлял 81,53 (73,27 - 154,21) пг/мл, что достоверно превышало значения, полученные при оценке 2D-культуры ($p < 0,05$) (табл. 10).

Уровень концентрации IL-15 в 2D-модели культивирования по истечении 48 часов был равен 22,11 (9,98 - 25,12) пг/мл, тогда как в трёхмерной модели культивирования продукция цитокина составила 75,41 (33,65 - 128,0) пг/мл, что было достоверно выше значений, полученных при оценке двумерной модели культивирования ($p < 0,05$) (табл. 10).

Продукция IL-6 в двумерной модели культивирования составила 92,98 (61,84 - 155,23) пг/мл, в трёхмерной модели культивирования концентрация IL-6 была равна 5355,81 (769,79 - 16254,37) пг/мл, что значительно

превышало значения, полученные при оценке 2D-культуры ($p < 0,05$) (табл. 10).

Концентрация IL-8 по окончании времени культивирования (48 часов) составила 3937,05 (2801,54 - 9256,32) пг/мл, в трехмерной модели культивирования продукция исследуемого цитокина достоверно отличалась от контрольной 2D-культуры и была равна 19673,07 (10203,02 - 29126,43) пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 10).

Таблица 10. Концентрация (пг/мл) провоспалительных цитокинов и хемокинов, секретируемых неприлипающими иммунокомпетентными клетками крови человека в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования – 48 часов), Me ($Q_1 - Q_3$), $n=18$

Исследуемые показатели	2D-культура клеток ИК n=18	3D-культура клеток ИК n=18
IFNγ	292,34 (233,17 - 312,06)	378,82 (300,54 - 508,81) p < 0,05
TNFα	104,35 (76,83 - 110,01)	162,65 (95,32 - 282,42) p < 0,05
IL-2	19,32 (13,41 - 44,29)	81,53 (73,27 - 154,21) p < 0,05
IL-15	22,11 (9,98 - 25,12)	75,41 (33,65 - 128,0) p < 0,05

IL-6	92,98 (61,84 - 155,23)	5355,81 (769,79 - 16254,37) p< 0,05
IL-8	3937,05 (2801,54 - 9256,32)	19673,07 (10203,02 - 29126,43) p< 0,05

Примечание (здесь и в таблице 11, 12): p – достоверные различия с 2D-культурой иммунокомпетентных клеток, согласно *U* критерию Манна-Уитни.

Продукция IL-4 в контрольной 2D-модели культивирования по окончании времени инкубации (48 часов) составила 6,42 (5,28 - 8,23) пг/мл, в трехмерной модели культивирования концентрация исследуемого цитокина статистически значимо превышала значения 2D-культуры и была равна 9,03 (8,72 - 12,15) пг/мл (p< 0,05) (табл. 11).

Уровень IL-10 в двумерной культуре составил 15,63 (13,09 - 18,93) пг/мл, в условиях культивирования с трехмерным матриксом концентрация IL-10 определялся на уровне 23,14 (20,45 - 35,13) пг/мл, что достоверно превышало значения, полученные при оценке контрольной 2D-модели (p< 0,05) (табл. 11).

Продукция IL-13 по окончании времени культивирования в контрольной 2D-культуре составило 16,92 (14,21 - 18,34) пг/мл, тогда как культивирование иммунокомпетентных клеток в присутствии 3D-матрикса привело к увеличению концентрации цитокина до 21,64 (19,55 - 44,32) пг/мл (p< 0,05) (табл. 11).

Таблица 11. Концентрация (пг/мл) противовоспалительных цитокинов, секретируемых неприлипающими иммунокомпетентными клетками крови человека в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования – 48 часов), Me (Q₁ - Q₃),

Исследуемые показатели	2D-культура клеток ИК n=18	3D-культура клеток ИК n=18
IL-4	6,42 (5,28 - 8,23)	9,03 (8,72 - 12,15) p < 0,05
IL-10	15,63 (13,09 - 18,93)	23,14 (20,45 - 35,13) p < 0,05
IL-13	16,92 (14,21 - 18,34)	21,64 (19,55 - 44,32) p < 0,05

Оценка уровня гемопоезинов, ангиопоэзинов и факторов роста, секретируемых иммунокомпетентными клетками крови человека показала достоверное увеличение уровня Eotaxin в трёхмерной модели культивирования (24,51 (20,62 - 45,36) пг/мл) по сравнению с двумерной контрольной культурой 17,09 (14,23 - 19,65) пг/мл (p < 0,05) (табл. 12).

Исследование концентрации G-CSF по окончании времени культивирования позволило выявить, что в двумерной модели культивирования его уровень был равен 24,36 (22,91 - 33,28) пг/мл, тогда как трёхмерный искусственный матрикс, имитирующий регенерирующую

костную ткань статистически достоверно увеличивает концентрацию исследуемого цитокина до 972,19 (431,64 - 2998,55) ($p < 0,05$) (табл. 12).

Концентрация IL-7, напротив, оказалась сниженной в трехмерной модели культивирования по истечении 48 часов и была равна 11,54 (7,86 - 20,02) пг/мл, в сравнении со значениями, полученными при оценке 2D-культуры - 23,04 (18,23 - 25,41) пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 12).

Таблица 12. Содержание (пг/мл) гемопозитинов, ангиопозитинов и факторов роста, секретируемых неприлипающими иммунокомпетентными клетками крови человека в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования – 48 часов), Me (Q₁ - Q₃)

Исучаемые показатели	2D-культура клеток ИК n=18	3D-культура клеток ИК n=18
Eotaxin	17,09 (14,23 - 19,65)	24,51 (20,62 - 45,36) $p < 0,05$
G-CSF	24,36 (22,91 - 33,28)	972,19 (431,64 - 2998,55) $p < 0,05$
IL-7	23,04 (18,23 - 25,41)	11,54 (7,86 - 20,02) $p < 0,05$

Оценка провоспалительных факторов в культуре стромальных стволовых клеток человека показало, что действие искусственного трехмерного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань направлено, преимущественно, на снижение концентрации факторов с провоспалительной (IFN α , IFN γ , IL-6, TNF α), хемоаттрактантной (RANTES) и проапоптотической (TRAIL) активностью (табл. 13).

Так, уровень концентрации IFN γ (в сравнении с 2D культурой ССК) снизился более чем в 2 раза в трехмерной модели культивирования и составил 46,23(18,17-78,05) пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 13). Концентрация IL-6 также статистически значимо снижалась до 1051,61(592,1-1101,5) пг/мл по сравнению со значениями 2D-культуры ССК на пластике ($p < 0,05$) (табл. 13).

Уровень TNF α снижался в 3,7 раз по сравнению со значениями 2D-модель культивирования ССК и составил 22,31(12,08-27,35) пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 13). Также было обнаружено статистически значимое снижение уровня TRAIL при добавлении трехмерного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань ($p < 0,05$) (табл. 13). Концентрация RANTES, напротив, повышалась в 2,8 раза при культивировании в условиях трехмерной модели культивирования *in vitro* и составила 33,08 (19,21 - 76,22) пг/мл, по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$) (табл. 13). В смешанной модели культивирования ССК + ИК концентрация исследуемых провоспалительных цитокинов статистически значимо увеличивалась, как в условиях культивирования на пластике, так и при добавлении трехмерных матриксов, имитирующих регенерирующую костную ткань. Отличия были зафиксированы при сравнении с монокультурой иммунокомпетентных клеток, а также с монокультурой ССК. Важно отметить, что в смешанной 3D-культуре наблюдалось максимальная продукция IFN γ и RANTES. Максимальные значения IL-6 были задетектированы в смешанной двумерной модели культивирования (табл. 13). Нами были обнаружены следующие корреляции в экспериментальных 3D культурах ССК между числом [CD45,34,14,20]⁺ клеток и **RANTES** ($r=0,72$, $p < 0,05$), **IL-6** ($r=-0,73$, $p < 0,05$), **TNF α** ($r=-0,79$, $p < 0,05$), **SCF** ($r=0,81$, $p < 0,05$), **LIF** ($r=0,79$, $p < 0,05$), **G-CSF** ($r=0,71$, $p < 0,05$); **RANTES с числом мертвых клеток** ($r=-0,78$, $p < 0,05$).

Таблица 13. Содержание факторов с провоспалительной (IFN α , IFN γ , IL-6, TNF α), хемоаттрактантной (RANTES) и проапоптотической (TRAIL) активностью в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования - 14 суток), Me (Q₁ - Q₃), n=18

Исследуемые показатели	2D-культура клеток ИК n=18	3D-культура клеток ИК n=18	2D-культура клеток ССК n=18	3D-культура клеток ССК n=18	2D культура ССК+ИК n=18	3D культура ССК+ИК n=18
	1	2	3	4	5	6
IL-6, пг/мл	26,11 (15,98-45,53)	192,16 (129,23-229,01) p1 < 0,05	1888,09 (1462,53-2265,11) p1,2 < 0,05	1051,61 (592,1-1101,5) p1,2,3 < 0,05	7551,0 (4615,45-10494,1) p1,2,3,4 < 0,05	2242,67 (1663,02-4971,23) p1,2,3,4,5 < 0,05
TNFα, пг/мл	5,01 (3,99-10,04)	35,21 (30,01-38,99) p1 < 0,05	82,15 (77,76-94,84) p1,2 < 0,05	22,31 (12,08-27,35) p1,2,3 < 0,05	108,4 (101,11-115,23) p1,2,3,4 < 0,05	109,34 (104,12-125,28) p1,2,3,4 < 0,05
IFNγ, пг/мл	3,72 (0,13 – 11,34)	33,45 (15,98-49,21) p1 < 0,05	128,54 (83,98-151,03) p1,2 < 0,05	46,23 (18,17-78,05) p1,2,3 < 0,05	163,32 (125,09-179,49) p1,2,3,4 < 0,05	203,53 (184,42-244,71) p1,2,3,4,5 < 0,05

RANTES, пг/мл	19,02 (6,43-48,61)	118,23 (111,35- 195,22) $p_1 < 0,05$	11,51 (4,14 - 16,41) $p_{1,2} < 0,05$	33,08 (19,21 - 76,22) $p_{1,2,3} < 0,05$	473,51 (428,11-515,63) $p_{1,2,3,4} < 0,05$	538,41 (410,16-655,38) $p_{1,2,3,4,5} < 0,05$
TRAIL, пг/мл	0	0	4,43 (3,15 - 5,45)	2,80 (2,52 - 2,86) $p_3 < 0,05$	0	0

Примечание (здесь и в таблице 14): p_1 – достоверные различия с 2D-культурой иммунокомпетентных клеток, p_2 – достоверные различия с 3D-культурой иммунокомпетентных клеток, p_3 – достоверные различия с 2D-культурой стромальных стволовых клеток, p_4 – достоверные различия с 3D-культурой стромальных стволовых клеток, p_5 – достоверные различия со смешанной 2D-культурой стромальных стволовых клеток+иммунокомпетентных клеток, согласно U критерию Манна-Уитни.

Оценка противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, IL-13) в культуре стромальных стволовых клеток человека также показала, что добавление трехмерного матрикса в среду культивирования статистически значимо снижает уровень концентрации IL-4, IL-10, IL-13 ($p < 0,05$) (табл. 14).

Так, в трехмерной монокультуре ССК концентрация IL-4 составила 0,52(0,31-1,11) пг/мл, тогда как в культуре ССК на пластике его уровень был равен 2,45(2,15-3,43) ($p < 0,05$) (табл. 14).

Аналогичная тенденция наблюдалась при оценке концентрации IL-10 и IL-13. При культивировании ССК в присутствии трехмерного матрикса содержание IL-10 в супернатантах клеточных культур снижалось в 2,5 раза и составило 10,82 (6,61-14,23) пг/мл, концентрация IL-13 также снижалась в 6,5 раз по сравнению с моделью культивирования ССК на пластике ($p < 0,05$) (табл. 14).

Однако в смешанной модели культивирования ССК + ИК уровень концентрации исследуемых противовоспалительных цитокинов статистически значимо повышались так в условиях культивирования на пластике, так и в присутствии трехмерных матриксов, имитирующих регенерирующую костную ткань ($p < 0,05$) (табл. 14).

Таблица 14. Концентрация (пг/мл) противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, IL-13) в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования - 14 суток), Ме (Q₁ - Q₃)

Исследуемые показатели	2D культура ИК n=18	3D культура ИК n=18	2D культура ССК n=18	3D культура ССК n=18	2D культура ССК+ИК n=18	3D культура ССК+ИК n=18
	1	2	3	4	5	6
IL-4	0,41 (0,23-0,56)	1,31 (0,84-1,65) p1 < 0,05	2,45 (2,15-3,43) p1,2 < 0,05	0,52 (0,31-1,11) p1,2,3 < 0,05	3,83 (3,45-4,01) p1,2,3,4 < 0,05	4,23 (3,43-4,98) p1,2,3,4,5 < 0,05
IL-10	0,03 (0-1,98)	11,09 (8,98-15,05) p1 < 0,05	28,15 (24,02-31,21) p1,2 < 0,05	10,82 (6,61-14,23) p1,3 < 0,05	49,32 (43,61-53,04) p1,2,3,4 < 0,05	55,31 (45,71-59,03) p1,2,3,4,5 < 0,05
IL-13	1,64 (1,59-1,82)	2,69 (2,23-3,45) p1 < 0,05	4,90 (4,16-6,02) p1,2 < 0,05	0,82 (0-2,45) p1,2,3 < 0,05	32,15 (30,11-33,07) p1,2,3,4 < 0,05	33,04 (24,51-34,43) p1,2,3,4 < 0,05

Исследование гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF) в супернатантах культур стромальных стволовых клеток человека в различных условиях культивирования *in vitro* показало увеличение концентрации исследуемых факторов (табл. 15).

Так, в 2D-модели культивирования ССК концентрация LIF по истечении 14 суток культивирования составила 15,23 (9,75 - 17,09) пг/мл, тогда как добавление трехмерного матрикса в среду культивирования увеличивало продукцию LIF до 21,14 (18,39 - 22,19) пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 15). В смешанной 3D-модели культивирования отмечалось статистически достоверное повышение концентрации LIF по сравнению со всеми исследуемыми группами ($p < 0,05$).

Уровень Eotaxin в 2D-монокультуре ССК составил 45,18 (42,41 - 46,28) пг/мл. В трехмерной монокультуре ССК уровень Eotaxin статистически значимо повышался до 78,86 (65,91 - 82,15) пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 15). В смешанной модели культивирования наблюдалось статистически значимое повышение концентрации Eotaxin как в 2D-, так и в 3D-модели культивирования по сравнению с монокультурами ($p < 0,05$).

Концентрация IL-7 статистически значимо не изменялась в различных экспериментальных моделях культивирования.

Уровень SCF в трехмерной модели культивирования ССК также статистически значимо увеличивался и составил 13,32 (6,53 - 14,02) пг/мл, что в 2,8 раз превышало показатели, полученные при оценке 2D-модели ($p < 0,05$) (табл. 15). В смешанной 3D-модели культивирования отмечалось значимое увеличение концентрации SCF по сравнению с 2D- и 3D-монокультурами, а также с двумерной смешанной культурой ($p < 0,05$).

Также наблюдалось достоверное увеличение (в среднем, на 50%) концентрации G-CSF при культивировании в присутствии искусственного матрикса ($p < 0,05$) (табл. 15) и в смешанной модели культивирования ССК с иммунокомпетентными клетками.

Таблица 15. Содержание гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF) в супернатантах различных экспериментальных культур *in vitro* (срок культивирования - 14 суток), Ме (Q₁ - Q₃)

Изучаемые показатели	2D культура ССК n=18	3D культура ССК n=18	2D культура ССК+ИК n=18	3D культура ССК+ИК n=18
	1	2	3	4
LIF, пг/мл	15,23 (9,75 - 17,09)	21,14 (18,39 - 22,19) p1<0,05	19,83 (15,36 - 21,13) p1<0,05	35,92 (28,69 - 67,25) p1,2,3<0,05
Eotaxin, пг/мл	45,18 (42,41 - 46,28)	78,86 (65,91 - 82,15) p1<0,05	179,22 (173,49-185,43) p1,2<0,05	207,82 (147,44-236,11) p1,2,3<0,05
IL-7, пг/мл	14,32 (13,38-17,41)	14,28 (13,81-14,89)	14,15 (13,12-14,87)	15,81 (14,75-16,23)
SCF, пг/мл	4,87 (3,89 - 5,11)	13,32 (6,53 - 14,02) p1<0,05	6,95 (5,37 – 8,02) p2<0,05	23,19 (16,88 – 24,14) p1,2,3<0,05
G-CSF, пг/мл	15,09 (14,19 - 64,21)	24,42 (16,98 - 37,64) p1<0,05	21,99 (17,36 - 51,23) p1<0,05	44,54 (39,18 - 51,21) p1,2,3<0,05

Примечание (здесь и в таблице 16): p₁ – достоверные различия с 2D-культурой стромальных стволовых клеток, p₂ – достоверные различия с 3D-культурой стромальных стволовых клеток, p₃ – достоверные различия со смешанной 2D-культурой стромальных стволовых клеток+иммунокомпетентных клеток, согласно U критерию Манна-Уитни.

3.4. Определение уровня относительной экспрессии мРНК генов дифференцировки в разных экспериментальных культурах клеток в условиях *in vitro* в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием

Исследование уровня относительной экспрессии генов дифференцировки Т-лимфоцитов при сокультивировании с трехмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении времени культивирования экспрессия генов дифференцировки (*Gfi1*, *hnRNPLL*, *U2af114*) соответствовало значениям контрольных 2D-культур по истечении 48 часов культивирования (табл. 16).

Однако отмечалась тенденция к увеличению экспрессии мРНК генов-антагонистов: *Gfi1* и *U2af114*.

Оценка экспрессии мРНК генов дифференцировки в монокультурах иммунокомпетентных клеток по истечении 14 суток культивирования не показала статистически значимых отличий со значениями, полученными при оценке 2D-монокультур Т-клеток.

Сокультивировании с трехмерным матриксом в смешанной модели приводило к достоверному увеличению экспрессии мРНК гена *U2af114* на 87%. Оценка уровня относительной экспрессии генов дифференцировки Т-лимфоцитов при сокультивировании с трехмерным матриксом в смешанной культуре показала достоверное увеличение экспрессии мРНК гена *U2af114* на 87%. Увеличение транскрипции мРНК гена *U2af114* положительно коррелировало с числом Т-клеток памяти в смешанной 3D-культуре ($r=0,67$; $p<0,05$). Экспрессия мРНК генов *Gfi1*, *hnRNPLL* детектировалась на уровне значений трехмерной монокультуры Т-клеток.

Таблица 16. Уровень относительной экспрессии мРНК генов дифференцировки неприлипающих иммунокомпетентных клеток крови человека в различных экспериментальных культурах *in vitro*, n=18

Тестируемый ген	3D-модель ИК/48 часов *достоверность различий рассчитана относительно 2D-модели ИК/48 часов n=18	3D- модель ИК/14 суток *достоверность различий рассчитана относительно 2D-модели ИК/14 суток n=18	Смешанная 3D-модель ССК+ИК /14 суток *достоверность различий рассчитана относительно смешанной 2D-модели ССК+ИК/14 суток n=18
<i>Gfi1</i>	1,340 (0,96 – 1,45)	1,395 (1,03 – 1,45)	1,415 (1,112 – 1,62)
<i>hnRNPLL</i>	1,190 (0,87 – 1,23)	1,204 (0,94 – 1,29)	1,21 (1,06 – 1,38)
<i>U2af114</i>	1,65 (1,05 – 1,71)	1,67 (1,08 – 1,84)	1,87 (1,68 – 2,01) p2< 0,05

Примечание (здесь и к таблице 17): кратность (разы) экспрессии относительно референсного гена *RPLPO* получены при помощи оценки стандартной ошибки (SE) с помощью модифицированной формулы Пфаффла, $p1 < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с 2D культурой иммунокомпетентных клеток по U-критерию Манна – Уитни; $p2 < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с 3D культурой иммунокомпетентных клеток по U-критерию Манна – Уитни

Исследование уровня относительной экспрессии генов в стромальных стволовых клетках жировой ткани человека по истечении 14-суток сокультивирования *in vitro* с образцами, несущими кальций-фосфатное покрытие показало статистически достоверное увеличение экспрессии мРНК генов остеодифференцировки - *RUNX2*, *BMP6* и гена щелочной фосфатазы *ALPL* на 40% (табл. 17).

Уровень относительной экспрессии мРНК генов *BMP2*, *UBC*, *FGF*, *TBX5* и *SMURF* оставались на уровне контрольных значений.

Экспрессия мРНК генов *TBP* и *HPRT* показала тенденцию к увеличению в условиях 3D-культивирования, тогда как уровень мРНК *BGLAP*, напротив, снизился на 10 процентов

Таблица 17. Уровень относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки в стромальных стволовых клетках жировой ткани человека в различных экспериментальных культурах (срок культивирования - 14 суток), Me (Q1 - Q3), n=18

Определяемый ген	Уровень экспрессии трехмерная (3D) культура ССК n=18 *достоверность различий рассчитана относительно 2D-модели ССК	Уровень экспрессии трехмерная (3D) культура сокультивирования ССК+ИК n=18 *достоверность различий рассчитана относительно смешанной 2D-модели ССК+ИК
<i>RUNX2</i>	1,44 (1,07 – 1,79) p1 < 0,05	-1,52 ((-2,81) – (-1,43)) p2,3 < 0,05
<i>BMP2</i>	1,05 ((-1,40) – 1,57)	-2,42 ((-4,89) – 1,21) p2 < 0,05
<i>BMP6</i>	1,40 (1,04 – 1,69) p1 < 0,05	-
<i>BGLAP</i>	1,08 ((-1,41) – 1,69)	-3,49 ((-4,04) – (-2,81))

		p2<0,05
<i>ALPL</i>	1,44 (1,23 – 1,58) p1<0,05	2,14 (1,62 – 2,48) p2,3<0,05
<i>TBP</i>	1,14 ((-1,43) – 1,66)	-
<i>HPRT</i>	1,37 ((-1,29) – 1,90)	-
<i>UBC</i>	1,07 ((-1,47) – 1,67)	-
<i>FGF10</i>	1,06 ((-1,47) – 1,62)	-
<i>TBX5</i>	1,03 ((-1,33) – 1,51)	-
<i>SMURF1</i>	1,10 ((-1,41) – 1,32)	1,86 (1,44 – 2,83) p2,3<0,05

Примечание: кратность (разы) экспрессии относительно референсного гена *RPLPO* получены при помощи оценки стандартной ошибки (SE) с помощью модифицированной формулы Пфаффа, p1 <0,05 – достоверные различия по сравнению с 2D культурой стромальных стволовых клеток; p2 <0,05 – достоверные различия по сравнению со смешанной 2D культурой стромальных стволовых клеток+иммунокомпетентных клеток; p3< 0,05 – достоверные различия по сравнению с 3D культурой стромальных стволовых клеток.

3.5. Анализ суммарной площади очагов минерализации в разных экспериментальных культурах клеток в условиях *in vitro* в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием

Исследования фиксированных препаратов культур ССК показало, что количество клеток с морфологией кроветворных в 2D модели было равно 23,19 (18,42 – 27,12) на мм² снимка поверхности лунки (таблица 18).

При морфометрическом анализе 3D монокультуры ССК, в присутствии трехмерных матриксов покрытием, было выявлено статистически значимое повышение числа клеток с морфологией кроветворных в сравнении со результатами, полученными при изучении 2D модели и 2D_остео модели (более чем в 3 раза) (таблица 18). Нами была выявлена корреляционная взаимосвязь между площадью участков минерализации и остеокальцином ($r=0,82$, $p<0,05$), а также содержанием клеток с морфологией кроветворных ($r=0,79$, $p<0,05$); числа клеток с морфологией кроветворных с остеокальцином ($r=0,73$, $p<0,05$) в условиях дистантного сокультивирования ССК с трехмерным матриксом.

Исследование смешанной 2D-модели показало статистически достоверное увеличение площади минерализации по сравнению с 2D-моделью культивирования в ППС, однако суммарная площадь очагов минерализации была меньше таковой в 2D-модели_остео ($p<0,05$).

Оценка смешанной 3D-модели показала статистически значимое увеличение очагов минерализации (до 6,23 (4,45 – 7,43) мм² / см² лунки) по сравнению со всеми экспериментальными группами ($p<0,05$).

Таблица 18. Содержание клеток с морфологией кроветворных в культурах стромальных стволовых клеток человека в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования – 21 день), Ме (Q₁ - Q₃), n=18

Варианты культивирования ССК	Суммарная площадь очагов минерализации, мм ² / см ²	Число клеток с морфологией кроветворных (на мм ² снимка поверхности лунки планшета)
2D-культура ССК в ППС, <i>c=180</i>	0 (0 - 0,15)	23,19 (18,42 – 27,12)
2D-модель_остео, <i>c=200</i>	3,86 (2,68 – 5,41)	26,08 (22,45 – 32,14)
3D-культура ССК в ППС, <i>c=200</i>	2,44 (1,76 – 3,98) p1,2<0,001	89,61 (81,43-102,02) p1,2 < 0,001
Смешанная 2D-культура ССК+ИК в ППС, <i>c=180</i>	0,58 (0,21 – 0,64) p1,2<0,001	229,45 (178,34 – 278,23) p1,2,3<0,001
Смешанная 3D-культура ССК+ИК в ППС, n=6 <i>c=150</i>	6,23 (4,45 – 7,43) p2,3,4<0,001	338,65 (283,47 – 382,3) p1,2,3,4<0,05

Примечание (здесь и в таблице 19): *c* - число снимков. p1 <0,05 – достоверные различия по сравнению с 2D культурой стромальных стволовых клеток; p2< 0,05 – достоверные различия по сравнению с культурой 2D-модель_остео; p3< 0,05 – достоверные различия по сравнению с 3D культурой стромальных стволовых клеток, p4< 0,05 – достоверные различия по сравнению со смешанной 2D культурой стромальных стволовых клеток+иммунокомпетентных клеток.

3.6. Оценка уровня остеокальцина в супернатантах разных экспериментальных культур клеток в условиях *in vitro* в присутствии трёхмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием

Оценка остеокальцина в исследуемых культурах позволила выявить статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение его концентрации в 3D-культуре ССК (табл. 19). Уровень остеокальцина в 2D модели культивирования ССК на 21 сутки был равен 11,12 (10,23 - 13,76) нг/мл.

Таблица 19. Содержание остеокальцина в супернатантах культур стромальных стволовых клеток человека в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования - 21 день), Me (Q₁ - Q₃), n=18

Варианты культивирования ССК	Остеокальцин, нг/мл
2D-культура ССК в ППС n=18	11,12 (10,23 - 13,76)
2D-модель_остео n=18	22,56 (21,34 – 26,57) p1<0,05
3D-культура ССК в ППС n=18	18,68 (14,91 – 20,15) p1,2<0,05
Смешанная 2D-культура ССК+ИК в ППС n=18	12,98 (11,16 - 14,21) p2<0,05
Смешанная 3D-культура ССК+ИК в ППС n=18	20,53 (17,48 – 21,87) p1,2,3,4<0,05

Сравнительный анализ показал стимулирующее влияние 3D-матриксов как в моно-, так и в смешанных культурах ССК на секрецию остеокальцина

(ОК), но не достигал значений, полученных при использовании дифференцировочной среды.

3.7. Корреляционные взаимосвязи, обнаруженные между исследуемыми показателями

Корреляционные взаимосвязи, обнаруженные между исследуемыми показателями в различных экспериментальных культурах представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Корреляционные взаимосвязи между исследуемыми критериями в различных экспериментальных культурах.

Показатели	3D (ИК) 48 ч	3D (ССК) 14/21 сут.	3D (ИК+ССК) 14/21 сут.
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD95 ⁺	IL-4 (r = 0,81; p<0,05)		
	IL-15 ((r = - 0,71; p < 0,05)		
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD95 ⁺	IL-10 (r = 0,83; p<0,05)		
	IL-15 (r = - 0,74; p < 0,05)		
CD105 ⁺		ALPL (r=0,78, p <0,05)	(Ra) (r = - 0,91; p<0,05)
CD3 ⁺ CD45RO ⁺	CD3 ⁺ CD45RA ⁺ (r= -0,81; p<0,05)		U2AF26 (r=0,67; p<0,05)
[CD45,34,14,20] ⁺		CD90 ⁺ (r= -0,80; p<0,05)	(Ra) (r = 0,80; p<0,05)
		CD105 ⁺ (r= -0,76; p<0,05)	
		ALPL (r=0,70, p <0,05)	

		RANTES (r=0,72; p<0,05)	
		SCF (r=0,81; p<0,05)	
		G-CSF (r=0,71; p<0,05)	
		IL-6 (r=-0,73, p<0,05)	
		TNF α (r=-0,79, p<0,05)	
		LIF (r=0,79, p<0,05)	
<i>ALPL</i>		RANTES (r=0,69, p<0,05)	
		[CD45,34,14,20] ⁺ (r=0,70, p<0,05)	
		CD105 (r= 0,78; p<0,05)	
		<i>BMP-6</i> (r=0,96, p<0,05)	
<i>BMP-2</i>		<i>RUNX2</i> (r=0,96; p<0,05)	
RANTES		Число мертвых клеток (r= -0,78, p<0,05)	
		<i>ALPL</i> (r=0,69, p<0,05)	
		[CD45,34,14,20] ⁺ (r=0,72; p<0,05)	
Число клеток с морфологией кроветворных (21 сутки)		Площадь очагов минерализации (r=0,86; p<0,05)	
		Остеокальцин (r=0,84; p<0,05)	
Площадь очагов минерализации		Число клеток с морфологией кроветворных (21 сутки) (r=0,86; p<0,05)	
		Остеокальцин (r=0,84; p<0,05)	

Остеокальцин		Площадь очагов минерализации ($r=0,84$; $p<0,05$)	
		Число клеток с морфологией кроветворных (21 сутки) ($r=0,90$; $p<0,05$)	

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для реализации настоящего эксперимента были проведены исследования на границе раздела фаз живой/неживой материи, что имитировало систему «регенерирующая кость/кровотворное микроокружение». Был проведен цикл исследований, разделенных во времени, на пластиковой поверхности (2D-модель культивирования) и в присутствии трехмерных искусственных матриц, имитирующих регенерирующую костную ткань (3D-модель культивирования).

Для экспериментального моделирования кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток *in vitro*, нами были использованы трехмерные матрицы с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань. Индекс шероховатости поверхности трехмерного матрикса (Ra) был выбран в диапазоне 2-3 мкм, что соответствует блюдцеобразным углублениям, которые сформированы остеокластами в кости при ее физиологическом remodelировании [Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж., 2000; Иванов П.А., 2021].

4.1. Особенности взаимодействия неприлипающих иммунокомпетентных клеток и трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 48 часов культивирования

В ходе проведения настоящего эксперимента по истечении 48 часов культивирования было выявлено статистически значимое снижение общего количества кариоцитов в трехмерной культуре, на фоне статистически уменьшения количества живых клеток ($p < 0,05$) с одновременным увеличением числа иммунокомпетентных клеток в состоянии апоптоза и

мертвых клеток ($p < 0,05$) в трехмерной модели культивирования по сравнению с 2D-культурой.

По истечении 48-ч культивирования *in vitro* на пластике (2D-модель) культура иммунокомпетентных клеток (ИК) человека была представлена субпопуляцией $CD45^+CD3^+$ Т-лимфоцитов более чем на 97 %. Клеточная культура имела достаточную для эксперимента жизнеспособность. Процентное содержание субпопуляции $CD4^+$ клеток составило 66,83 (64,38 – 69,11)%, $CD8^+$ клеток – 33,17 (30,89 – 35,62)%. Важно отметить, что Т-клетки (как хелперные, так и цитотоксические популяции) экспрессировали молекулу костимуляции CD28, которая опосредовала их длительное выживание (таблица 7).

$CD4^+$ Т-клетки являются ключевыми компонентами адаптивного иммунитета, регулируя функционирование и жизнедеятельность других клеточных субпопуляций, формируя соответствующий фон, посредством продукции цитокинов и хемокинов, что определяет дальнейшую поляризацию иммунного ответа [van Leeuwen E.M.M. et al., 2009; Тодосенко Н.М., 2018].

$CD8^+$ Т-лимфоциты (Т-киллеры или цитотоксические Т-лимфоциты) обладают способностью к экспрессии факторов, которые инициируют клеточный апоптоз и контактный цитолиз клеток-мишеней и способны формировать иммунологическую память. Контактный цитолиз осуществляется благодаря механизму специфического распознавания отдельных антигенов возбудителя [O'Connor A.M., 2010].

Одним из важнейших биологических принципов поддержания постоянства внутренней среды организма является гомеостатическая регуляция содержания иммунокомпетентных клеток, которая поддерживается ауто- и паракринной регуляцией жизнедеятельности клеток при воздействии цитокинов [Hua X., 2001; Юрова К.А. и др., 2023]. Наивные Т-лимфоциты, которые не встречались с антигеном, отличаются

катаболическими реакциями и ограничением в продукции медиаторов [Jones R.G., 2007]. Инициация пролиферативного ответа Т-клеток – поликомпонентный процесс, который запускает продукция интерлейкина-2 (IL-2) и увеличение экспрессии его рецептора на клеточной поверхности (IL-2R) [Lin J., 2001]. Интерлейкин-2, является фактором роста Т-лимфоцитов, который необходим для запуска пролиферации Т-клеток и образования эффекторных клеток и лимфоцитов памяти [Abbas A.K. et al., 2018]. Рецептор к IL-2 (IL-2R), который экспрессируют разные виды клеток крови, включая CD4⁺, CD8⁺-клетки [Луговская С.А. и др., 2005], состоит из трех субъединиц: α-цепи (CD25), β-цепи (CD122) и γ-цепи (CD132). Различные комбинации субъединиц на клеточной мембране по-разному влияют на активацию иммунных клеток. Многочисленные исследования показали, что дефицит IL2Rα оказывает существенное влияние на реактивность иммунной системы у мышей [Li Y. et al., 2022]. Молекула CD25 считается «ранним» показателем активации Т-клеток и указывает на готовность клеток к пролиферации и дифференцировке [Graca L., Cobbold S.P., 2002.]. Т-клетки синтезируют IL-2Rα, когда они активируются IL-2, IL-15 или другими стимулами [Li Y. et al., 2022].

Увеличение числа клеток, несущих маркер ранней активации CD25 при сокультивировании с 3D-матриксами, преимущественно за счет популяции цитотоксических Т-лимфоцитов, свидетельствует об увеличении активационного потенциала клеток в присутствии трехмерного матрикса, что также подтверждается увеличенной функциональной активностью Т-лимфоцитов в 3D-модели по истечении 48 часов культивирования (таблица 7). IL-2, секретируемый CD4⁺ Т-клетками, также может влиять на активацию CD8⁺ Т-лимфоцитов [Li Y. et al., 2022]. Было показано, что IL-2 требуется на начальном этапе активации CD8⁺ Т-клеток при первичном ответе для формирования в дальнейшем эффективного ответа субпопуляцией CD8⁺ Т-лимфоцитов памяти [Williams M.A., 2006].

Также по истечении 48 часов культивирования, на поверхностной мембране Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов было выявлено увеличение экспрессии рецептора трансферрина – CD71, который детектируется на поверхности Т-лимфоцитов после их активации и считается косвенным критерием клеточной пролиферации [Ярилин А.А., 2010]. Молекула CD71 запускает процесс клеточной пролиферации путем проникновения ионов железа в активированную клетку [Хаитов Р.М., 2009].

Для сохранения гомеостаза иммунной системы необходимо соблюдение равновесия пролиферации иммунокомпетентных клеток и их апоптотической гибели. Нарушение этого баланса приводит к развитию патологических процессов. Усиленная пролиферация лимфоцитов сопровождается развитием аутоиммунной патологии, тогда как усиление апоптотической гибели иммунокомпетентных клеток приводит к развитию иммунодефицитных состояний [Elmore S., 2007].

Естественным окончанием процесса клеточной дифференцировки является активационный апоптоз. CD95 (APO-1, FAS) представляет собой маркер готовности лимфоцитов к запуску активационного апоптоза. Этот рецептор экспрессируется повсеместно, включая активированные Т-лимфоциты. Экспрессия молекулы CD95 слабо выражена на Т-клетках, которые находятся в состоянии покоя, тем не менее активация лимфоцитов сопровождается значительным увеличением экспрессии CD95 [Elmore S., 2007].

Апоптоз, который обусловлен активацией CD95, необходим для снижения числа активированных клеток [Gupta S., 2008]. Однако отмечается, что Т-клетки памяти не чувствительны к Fas/FasL апоптозу, вероятно, из-за высокого уровня экспрессии митохондриальных белков Bcl-X (L) и Bcl-2 в этих клетках. Также показано, что IL-15 протектирует CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты памяти от Fas/FasL-индуцированного апоптоза [Strasser A. et al., 2009], в связи с этим, высокие концентрации IL-15, полученные при оценке

3D-модели культивирования (по истечении 48 часов) защищают клетки от апоптоза, что подтверждается выявленными отрицательными корреляционными взаимосвязями между числом клеток $CD4^+CD95^+$ и $CD8^+CD95^+$ с уровнем IL-15 в присутствии трехмерного матрикса ($r = -0,71$; $p < 0,05$; $r = -0,74$; $p < 0,05$).

IL-7 выполняет функцию протекции выживания и инициирует пролиферативную активность наивных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов [Shou C. et al., 2011; Osborne L.C. et al., 2011], тем не менее, поддержание жизнеспособности наивных лимфоцитов обусловлено, главным образом, активацией Т-клеточного рецептора. В проведенном исследовании активация клеток была вызвана неспецифическим раздражителем, без участия TCR, в связи с этим, роль IL-7 в поддержании выживания и клеточной пролиферации не определялась, кроме того, нами было задетектировано достоверное снижение концентрации IL-7 в 3D-модели культивирования [Kawabe T. et al., 2021]. Было показано, что наивные клетки способны снижать экспрессию рецепторов к цитокинам, в том числе к IL-7 [Korn T., Hiltensperger M., 2021].

Отмечается, что экспрессия CD95 на поверхности клеток также может свидетельствовать о терминальной фазе созревания и дифференцировки лимфоцитов [Хайдуков С.В. и др., 2003].

Также нами было выявлено увеличение концентрации провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF α , IFN γ) по истечении 48 часов культивирования, что оказывает непосредственное влияние на функциональную активность иммунокомпетентных клеток.

IL-6 является важным фактором поддержания клеточной пролиферации и инициации дифференцировочного потенциала Т-лимфоцитов, влияя, преимущественно, на популяцию Т-хелперов [Korn T., Hiltensperger M., 2021]. IL-6 принимает участие в инициации большого комплекса местных проявлений воспаления. Он оказывает влияние на миграцию фагоцитов,

способствует выработке СС-хемокинов, которые привлекают моноциты и лимфоциты в область регенерации, и снижая продукцию СХС-хемокинов, которые привлекают нейтрофилы. Эффекты IL-6 провоспалительной направленности, выражены слабее, чем у TNF α , который не увеличивает, а, напротив, снижает выработку провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF α) и хемокинов клетками, вовлеченными в воспалительный и регенерирующий процесс. В связи с этим, IL-6 является плейотропным цитокином, сочетающим свойства про- и противовоспалительных цитокинов. IL-6 оказывает влияние на различные этапы гемопоэза, в том числе на пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток. Отмечается также, что IL-6 повышает активность цитотоксических Т-лимфоцитов [Ярилин А.А., 2010]. Известно, что интерлейкин-6 (IL-6) и TNF- α индуцируют системную реакцию с помощью миграции иммунокомпетентных клеток в очаг регенерации, увеличения продукции компонентов внеклеточного матрикса и стимуляции ангиогенеза. Хемокины играют ключевую роль в функционировании адаптивной иммунной системы, контролируя миграцию, локализацию и функцию иммунных клеток во время воспаления [Brylka L.J., Schinke T., 2019].

TNF α представляет собой плейотропный цитокин, участвующий в воспалении и иммунной регуляции. TNF α , помимо активации провоспалительных генов и инициации иммунного ответа, может также запускать процессы клеточной гибели (как апоптоз, некроз, некроптоз) [Atretkhany K.-S.N. et al., 2020]. Механизм активации апоптоза осуществляется через мембранные рецепторные молекулы, которые относят к семейству рецепторов TNF α [Ярилин А.А., 2010]. TNF α усиливает все эффекты, реализуемые IFN γ - единственным представителем II типа интерферонов, который обладает провоспалительными эффектами. Важным функциональным эффектом совместного действия TNF α и IFN γ является ингибирование процесса фиброгенеза [Ярилин А.А., 2010].

Оценка группы противовоспалительных цитокинов также показала статистически значимое увеличение концентрации цитокинов IL-4, IL-10, IL-13 по истечении 48 часов культивирования в присутствии трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием.

Эффекты IL-4 и IL-13 синергичны и направлены на обеспечение регенераторного потенциала Т-лимфоцитов. Они являются характерными цитокинами иммунного ответа типа 2 [Ho I.-C., Miaw S.-C., 2016]. Также отмечается, что IL-4 и IL-13 считаются ключевыми медиаторами в патогенезе фибропролиферативных заболеваний. Сверхактивная передача сигналов оси IL-4/IL-13 способствует возникновению и прогрессированию фиброзных заболеваний кожи [Nguyen J.K. et al., 2020]. Таким образом, группы цитокинов IL-4/IL-13 и TNF α /IFN γ являются антагонистами регуляции процесса фиброгенеза. В случае преобладания концентрационной активности цитокинов TNF α /IFN γ , можно наблюдать эффективный иммунный ответ без формирования фиброзной ткани на месте повреждения.

Известно, что воспаление является необходимым этапом клеточной регенерации. Начальная провоспалительная фаза индуцирует последующие фазы заживления, которые связаны с анаболическими процессами. Эффективная санация очага повреждения и продукция цитокинов, способствующих регенерации и восстановлению тканевого гомеостаза, приводит к (нео)ангиогенезу [Loi F. et al., 2016]. Увеличение концентрации противовоспалительных цитокинов можно рассматривать также как фактор, регулирующий длительность острой фазы воспаления посредством ингибирования реакций врожденного и приобретенного иммунитета, что является необходимым этапом для предупреждения тканевых повреждений. Обнаруженные нами отрицательные корреляционные взаимосвязи IL-4 с CD4⁺CD95⁺ ($r=0,81$; $p<0,05$) и IL-10 с CD8⁺CD95⁺ ($r=0,82$; $p<0,05$) подтверждают этот тезис.

В ходе проведенного исследования также было отмечено увеличение числа CD45R0⁺ лимфоцитов иммунной памяти и увеличения количества клеток, которые экспрессируют на мембране молекулы CD45R0⁺ и CD45RA⁺. Детекция на клеточной мембране изоформы CD45R0⁺ (вместо CD45RA⁺), является фенотипическим подтверждением дифференцировки наивных Т-клеток в Т-клетки памяти. В крови обнаруживают 3 субпопуляции Т-лимфоцитов, в зависимости от стадии дифференцировки: [CD45RA⁺CD45R0⁻] — наивные/непримированные Т-клетки; [CD45RA⁻CD45R0⁺] — Т-клетки памяти и [CD45RA⁺CD45R0⁺] — переходные формы Т-лимфоцитов. Общий лейкоцитарный рецептор CD45, структурно схожий с Т-клеточным рецептором, является необходимым для обеспечения функциональной активности Т-клеток, в том числе для передачи сигнала, опосредованного через TCR [Литвинова Л.С. и соавт., 2015].

Корреляционный анализ показал отрицательную взаимосвязь между числом CD3⁺CD45RA⁺ и CD3⁺CD45R0⁺ клеток ($r = -0,81$; $p < 0,05$), что подтверждает образование Т-лимфоцитов памяти посредством дифференцировки в условиях культивирования с трехмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань. Стоит отметить, что увеличение процентного содержания CD3⁺CD45R0⁺ Т-лимфоцитов в 3D-культурах наблюдалось на фоне увеличения числа клеток, несущих наивные изоформы CD45RA⁺. Таким образом, нами выявлено, что в присутствии неспецифического активатора – трехмерного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань, клетки способны дифференцироваться в клетки иммунологической памяти, а также образовывать переходные, дубль-позитивные формы Т-лимфоцитов.

Доказанное увеличение числа CD45R0⁺ лимфоцитов при культивировании с трехмерным искусственным матриксом может указывать на возможное формирование клеток с аутоиммунным потенциалом, тем не менее, увеличение концентрации IFN γ , IL-4 и IL-2 [Норкин И.К. и др., 2021],

ингибирующих клеточную дифференцировку в направлении Th17 свидетельствует о формировании компенсаторного механизма, защищающего от развития аутоиммунных реакций [Korn T., Hiltensperger M., 2021]. Опасность потенциального нарушения гомеостаза, срыва иммунологической толерантности, приводящее к развитию аутоиммунных заболеваний в условиях замещения костных дефектов искусственными материалами [Тодосенко Н.М., 2018], имитирующими регенерирующую костную ткань, не вызывает сомнений. В настоящее время многими исследователями активно обсуждаются взаимосвязи аутоантител с ремоделированием кости [Llorente I. et al., 2020].

В исследовании феномена иммунологической памяти уделяют внимание молекулярно-генетическим механизмам дифференцировки непримированных Т-клеток в Т-лимфоциты иммунной памяти [Heyd F., Lynch W.K., 2010]. Отмечается, что дифференцировка клеток и формирование Т-лимфоцитов памяти регулируется путем реализации процесса альтернативного сплайсинга гена *Ptpnc*, кодирующего молекулу CD45 - трансмембранную тирозинфосфатазу [Heyd F. et al., 2006; Литвинова Л.С. и др., 2013].

Экспрессия изоформ CD45 строго регулируется в периферических Т-лимфоцитах [Tong A. et al., 2005] с помощью активации генов *hnRNPLL* (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L Like*), *U2af114* (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4) и *Gfi1* (growth factor independent 1). Взаимодействие продуктов указанных генов регулирует процесс дифференцировки Т-лимфоцитов [Butte J.M. et al., 2012]. Особенности взаимодействия указанных факторов регулируют экспрессию вариантов рецептора CD45 на поверхности клеток. Высокий уровень относительной экспрессии мРНК *U2af114* инициирует образование коротких изоформ CD45R0, посредством содействия экзона исключения. Повышенная экспрессия мРНК *Gfi1*, напротив, приводит к формированию более длинной

изоформы CD45RB [Сохоневич Н.А. и др., 2015].

Молекула CD28 известна как ключевой костимулирующий рецептор, который необходим для активации непримированных Т-клеток. Активация CD28 инициирует механизм регуляции альтернативного сплайсинга в Т-лимфоцитах посредством активации гена *hnRNPLL* [Butte J.M. et al., 2012]. Проведенные ранее исследования убедительно доказывают, что повышенная экспрессия мРНК гена *hnRNPLL* способствует пропуску экзона 4, тогда как уменьшение экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* приводит к включению экзона, главным образом, в активированных лимфоцитах [Topp D.J. et al., 2008].

При исследовании влияния трехмерного матрикса на процессы клеточной дифференцировки с определением уровня относительной экспрессии мРНК генов *U2af1l4*, *hnRNPLL*, *Gfi1*, было выявлено незначительное (менее чем в 2 раза) повышение уровня экспрессии генов *hnRNPLL* и *Gfi1* в 3D-моделях (как при сокультивировании с ССК, так и без него) культивирования по сравнению с интактной 2D-культурой. Транскрипция мРНК гена *U2f1l4* повышалась (в 1,65 раза) в физиологической модели и по сравнению с интактными 2D-культурами (таблица 16).

Таким образом, в ходе проведенного исследования было установлено, что трехмерный матрикс с кальций-фосфатным покрытием, в условиях дистантного взаимодействия, оказывает влияние на функциональную активность иммунокомпетентных клеток по истечении 48 часов культивирования, потенцируя активацию и пролиферацию клеток в 3D-модели, посредством ауто- и паракринного влияния биологически активных медиаторов (цитокинов, хемокинов, факторов роста), продуцирующихся иммунокомпетентными клетками. Важно отметить, что активация клеток инициирована неспецифическим раздражителем, без участия TCR. Также отмечается увеличение числа CD45R0⁺ лимфоцитов иммунной памяти и дубль позитивных изоформ [CD45R0⁺/CD45RA⁺] клеток, что является

фенотипическим признаком дифференцировки наивных Т-клеток в Т-клетки памяти (рис. 16).

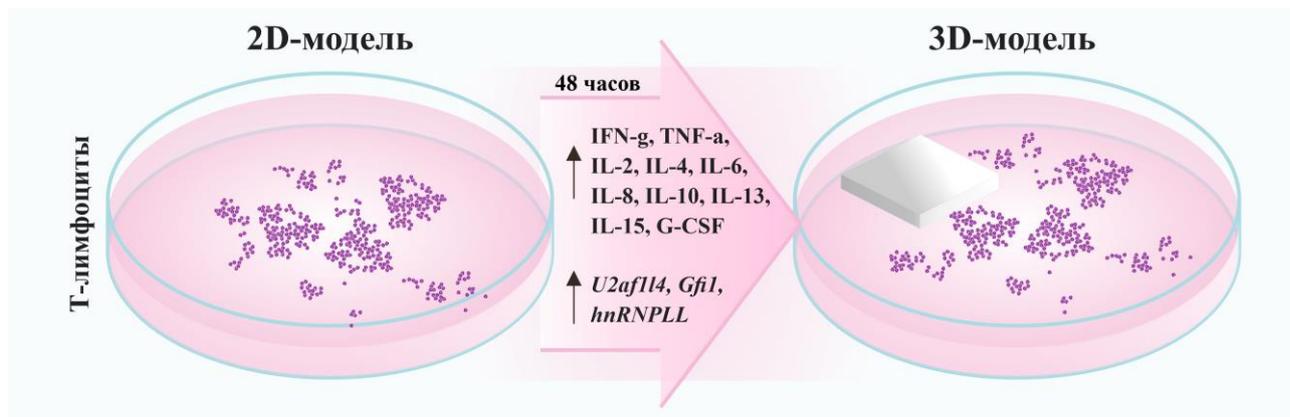


Рисунок 16. Кооперация неприлипающих иммунокомпетентных клеток и трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 48 часов культивирования

4.2. Особенности взаимодействия стромальных стволовых клеток с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 14 и 21 суток культивирования

Особенности жизнедеятельности и функциональной активности ССК зависят от условий микросреды, за счет изменения пространственной организации, запускающей изменения генетического аппарата клеток, что значительно влияет на секретом и ауто- и паракринную регуляцию клеток [Wu X. et al., 2013]. В соответствии с данными, полученными McCafferty М.М. и соавт. (2014), такие характеристики матрикса, как то - жесткость, топография и химия поверхности, могут приводить к ремоделированию клеточного цитоскелета и формированию очаговой адгезии, предшествующих этапу дифференцировки ССК через опосредованные интегрином сигнальные пути [McCafferty М.М. et al., 2014].

Принадлежность клеток, полученных из липоасpirата, к ССК определяли по следующим критериям [Ando W. et al., 2012; Bourin P. et al., 2013; Hart D.A., 2014; Wechsler M.E. et al., 2016; Kwon A. et al., 2016; Liu T.M., 2017; Иванов П.А., 2021]: 1) жизнеспособность клеток от 90 %; 2) экспрессия на клеточной мембране молекул CD73, CD90 и CD105; и отсутствие маркеров кроветворных клеток - CD45,34,20,14 (до 0,1%); 3) адгезия к пластиковой поверхности и возможность дифференцироваться в хондрогенном, остеогенном и адипогенном направлениях в условиях *in vitro*.

Клеточная культура, использованная в настоящем эксперименте, имела жизнеспособность более 91%; по истечении 21-дневного культивирования с применением коммерческих дифференцировочных сред StemPro® Differentiation Kit («Thermo Fisher Scientific», США) была зафиксирована позитивная окраска на альциановый синий (хондробласты), ализариновый красный (остеобласты) и масляный красный (адипоциты). В условиях культивирования клеток в стандартной культуральной среде (без специализированных и дифференцировочных компонентов), более 95% адгезированных клеток экспрессировали на клеточной мембране маркеры CD73, CD90 и CD105; число клеток, экспрессирующих молекулы CD45,34,20,14 не превышало 0,01%. Таким образом, культура ССК, которая была использована в настоящем эксперименте, полностью соответствовала критериям, предъявляемым к ССК.

В ходе проведенного исследования, по истечении 14 суток культивирования было обнаружено, что наличие искусственных трехмерных матриц (Ra=2,0-3,0 мкм) в среде культивирования ССК, потенцировало достоверное повышение (более чем в 2 раза) количества [CD45,34,14,20]⁺ клеток в сравнении с аналогичными показателями в 2D-культурах. Увеличение числа клеток с фенотипом гемопоэтических отмечалось на фоне статистически значимого сокращения числа клеток [CD73,CD90,CD105]⁺ (таблица 9).

Обнаруженные отрицательные корреляционные ассоциации процентного содержания кроветворных клеток [CD45,34,14,20]⁺ с количеством ССК, в том числе с маркерами CD90 ($r=-0,80$; $p<0,05$) и CD105 ($r=-0,76$; $p<0,05$), подтверждает скоординированность процессов, протекающих в популяциях гемопоэтических и стромальных стволовых клеток. Таким образом, изменение презентации маркеров CD73, CD90 и CD105 на мембране ССК, оказывает значительное влияние на модуляцию дифференцировочного потенциала ССК в сторону остеобластов.

Молекула клеточной дифференцировки CD90 (антиген 1 клеток тимуса; Thy-1) является характерным маркером ССК, впервые идентифицированный во время поиска специфических антител, распознающих клетки тимомы [Saalbach A., 2019]. Обнаружено, что при условии дифференцировки ССК, экспрессия CD90 на клеточной поверхности уменьшается. Так, Moraes D.A. et al. (2016) обнаружили, что уменьшение экспрессии молекулы CD90 в культуре ССК, полученных из любых доступных источников, сопровождается более эффективной дифференцировкой клеток в остеогенном направлении [Moraes D.A. et al., 2016].

Молекула CD73 также является классическим маркером ССК [Shin E.Y. et al., 2018; Netsch P. et al., 2018]. Экспрессия молекулы CD73 на клеточной мембране контролируется передачей сигналов Wnt- β -катенина, что является одним из основных путей костного гомеостаза [Spychala J., Kitajewski J., 2004; Иванов П.А., 2021]. Изменение презентации CD73 на клеточной мембране модулируется провоспалительными цитокинами и факторами роста, такими как TGF- β , TNF α , IL-1 β [Hunsucker S.A. et al., 2005].

Было показано, что CD73 оказывает регулирующее воздействие на контроль остеогенной и хондрогенной дифференцировки ССК [Takedachi M. et al., 2012; Ode A. et al., 2013]. Это доказывает, что изменение презентации CD73 на клеточной мембране играет важную роль в регуляции дифференцировочного потенциала ССК [Ode A. et al., 2013].

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) могут дифференцироваться в остеокласты, которые играют ключевую роль в регенерации кости. Совместное культивирование ССК и ГСК может привести к их одновременной дифференцировке в остеобласты и клетки крови соответственно. Таким образом, ГСК играют ключевую роль в остеогенезе [Jia Y. et al., 2021].

Изучение физиологических молекулярно-генетических механизмов регуляции жизнедеятельности остеокластов и остеобластов позволило выявить, что микроокружение ССК и эластичность внеклеточного матрикса являются главными факторами, которые определяют клеточную дифференцировку [Ozdemir T. et al., 2019].

Форма клетки ССК регулируется контактом клеточной поверхности с окружающей средой. Во время этих взаимодействий клетки генерируют специфические сигналы путем образования и диссоциации адгезионных комплексов. Недифференцированные ССК характеризуются преимущественно фибробластоподобной формой и хорошо распределяются на пластике для адгезивной культуры, при этом различные изменения в клеточной дифференцировке вызывают серьезные преобразования формы [Sonowal H. et al., 2013].

Результаты, полученные Sutherland J. et al. (2005), указывают на то, что на клеточную адгезию и пролиферацию влияют топография поверхности. Также отмечается, что цитоскелет проявляет наиболее высокое напряжение на грубых поверхностях [Sutherland J. et al., 2005]. Трансформация цитоскелета оказывает влияние на распределение органелл и ДНК в цитоплазме клеток, что модулирует их жизнедеятельность и функциональную активность [Thomas C.H. et al., 2002]. Shafrir Y. и соавт. (2002) было показано, что микрофиламенты пересекают ядерные поры и соединяются с ядерной мембраной, таким образом формируя путь для пропускания сигналов от механических стимулов [Shafrir Y., Forgacs G.,

2002]. Независимые исследования McBeath R. (2004) и Prowse P.D. (2013) доказали, что топография трехмерного искусственного матрикса может модулировать в остеогенном направлении дифференцировку ССК через изменения цитоскелета [Prowse P.D. et al., 2013]. Исследователи предположили, что распределение актинового цитоскелета, в том числе, нитевидного актина (F-актина), меняется на шероховатых поверхностях [Luthen F. et al., 2005], играя ключевую роль в остеогенной дифференцировке ССК [Mathieu P.S., Lobo E.G., 2012; Юрова К.А. и др., 2021]. Актиновый цитоскелет изменяется в соответствии с этапами дифференцировки ССК в остеобласты: появляется некоторое количество толстых пучков актиновых нитей, расположенных на периферии дифференцированных клеток вместо большого количества тонких параллельных микрофиламентных пучков, распространяющихся по всей цитоплазме в недифференцированных ССК [Mathieu P.S., Lobo E.G., 2012]. Изменение архитектуры цитоскелета сопровождается передачей сигналов в ядро и приводит к активации ядерных транскрипционных факторов YAP/TAZ, которые регулируются актиновым цитоскелетом. Этот факт объясняет участие механических стимулов в остеогенной дифференцировке ССК [Dupont S. et al., 2011]. Yang W. и соавт. (2016) в своих исследованиях доказали, что разная топография поверхности по-разному влияет на индукцию транскрипционных факторов YAP/TAZ, что приводит к модуляции уровня относительной экспрессии мРНК остеодифференцировочных генов [Yang W. et al., 2016].

Транскрипционные факторы YAP/TAZ принимают участие в дифференцировке ССК с помощью активации ко-активатора RUNX2 - остеобласт-специфического транскрипционного фактора, который влияет на экспрессию генов остеодифференцировки [Steward A.J., Kelly D.J., 2015].

В результате проведенного исследования выявлено достоверное увеличение уровня (на 44%) относительной экспрессии мРНК *RUNX2* по истечении 14 суток культивирования в 3D-модели культивирования по

сравнению с 2D-контролем (таблица 17). Также нами было выявлено значительное число прямых корреляционных взаимосвязей *RUNX2* с ключевыми факторами остеодифференцировки.

RUNX2 был описан как самый ранний остеогенный маркер [Gromolak S. et al., 2020] и считается одним из основных детерминант генеза остеобластов из ССК. *RUNX2* представляет собой главный фактор транскрипции для дифференцировки остеобластов, образования внеклеточного матрикса и минерализации во время формирования кости. *RUNX2* регулирует активность гена щелочной фосфатазы (*ALPL*), которая является ранним индикатором клеточной активности и дифференциация [Kulterer B. et al., 2017; Choi J.-W. et al., 2017].

Оценка уровня относительной экспрессии гена щелочной фосфатазы также показала статистически значимое увеличение мРНК *ALPL* на том же уровне – 43% (таблица 17). Щелочная фосфатаза создает необходимое микроокружение для последующей минерализации межклеточного матрикса [Zheng J. et al., 2018]. Оценка корреляционных взаимосвязей позволила выявить положительное взаимодействие между уровнем экспрессии мРНК гена *ALPL* и количеством CD105⁺ клеток ($r=0,78$, $p<0,05$). Молекула CD105, которая также известна как эндоглин, индуцирует экспрессию мРНК гена *BMP-2* (морфогенетического белка кости), который является важным фактором при дифференцировке остеобластов, в том числе потенцируя активность гена *ALPL* [Wu S. et al., 2018]. Увеличение уровня относительной экспрессии мРНК гена *ALPL* способствует накоплению в межклеточном пространстве неорганических фосфатов в свободной форме, образующих химические связи с Ca²⁺, что способствует формированию минерального матрикса кости. Hrubí E. и соавт. (2018) было показано, что увеличение уровня относительной экспрессии мРНК гена *BMP-2* имеет позитивную ассоциацию с индукцией щелочной фосфатазы, преимущественно, за счет передачи сигналов через ERK и цАМФ / протеинкиназу [Hrubí E. et al., 2018].

В настоящем исследовании была обнаружена сильная корреляционная взаимосвязь между экспрессией мРНК генов *BMP-2* и *RUNX2* ($r=0,96$; $p=0,001$), так как *RUNX2* представляет собой ключевую мишень *BMP*-зависимого пути [Wu S. et al., 2018] и *ALPL* с *BMP-6* ($r=0,96$, $p<0,05$), который обладает сходными функциями с *BMP2* и индуцирует усиленную остеодифференцировку, индуцируя экспрессию мРНК остеодифференцировочных генов, а также увеличивает активность щелочной фосфатазы, инициируя матричную минерализацию [Wu S. et al., 2018].

Было отмечено, что уровень относительной экспрессии мРНК *BMP-6* также оказался достоверно выше на 40% при культивировании ССК в присутствии 3D-матрикса по сравнению с 2D-контролем по истечении 14 суток культивирования (таблица 17).

Таким образом, повышенная экспрессия генов *RUNX*, *BMP6* и *ALPL* в трехмерной модели культивирования на 14 сутки культивирования *in vitro* отражает цепь событий, связанных с дифференцировкой ССК в остеобласты и ранними этапами минерализации внеклеточного матрикса, обусловленными, преимущественно, выходом ионов кальция из КФ покрытия в среду.

Важной, по нашему мнению, оказалась обнаруженная положительная корреляционная взаимосвязь между уровнем относительной экспрессии мРНК гена *ALPL* и количеством клеток с фенотипом гемопоэтических $[CD45,34,14,20]^+$ ($r=0,70$, $p <0,05$), в трехмерной модели культивирования по сравнению с 2D-контролем, что может косвенно указывать на процесс формирования так называемой «ниши остеобластов», с созданием гемопоэтического микроокружения.

Дифференцировка ССК в остеогенном направлении способствует образованию «остеобластных ниш», которые способны инициировать процессы гемопоэза [Taichman R.S., 2005]. Таким образом, увеличение числа клеток с кроветворным иммунофенотипом $[CD45,34,14,20]^+$ (с 0,33% до

0,69%, $p=0,0013$) в экспериментальной 3D культуре, на фоне уменьшения количества клеток, которые экспрессируют на клеточной мембране маркеры ССК CD73, CD90 и CD105 (табл. 9) и наряду с минерализацией внеклеточного матрикса, убедительно доказывает выраженную дифференцировку части ССК в остеобласты, в присутствии трехмерного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань.

Кости обычно состоят из твердой кальцинированной внешней части (известной как кортикальная или компактная кость) и внутреннего ядра трабекулярной или губчатой кости, содержащего костный мозг с гемопоэтическими стволовыми и предшественниками. Было показано, что сосудистая сеть костного мозга влияет на формирование и поддержание ниш костного мозга, необходимых для кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников, и способствует продуктивному кроветворению [Mendez-Ferrer S. et al., 2010; Ding L., Morrison S.J. 2013; Watson E.C., Adams R.H., 2018].

Описано, что в гипоксических областях тканей, не богатых сосудистой сетью (таких как трабекулярная зона кости для ГСК), локализуются ниши, в которых стволовые клетки находятся в состоянии покоя [Jang Y.-Y., Sharkis S.J. 2007]. Это является необходимым фактором для сохранения ГСК в состоянии покоя (замедленный цикл или G0) [Yin T., Li L., 2006.]. Сосудистая ниша, которая обогащена кислородом, наоборот, способствует функциональной активности короткоживущих гемопоэтических клеток (которые являются предшественницами стволовых клеток) [Cheshier S.H. et al., 1999]. Биорегуляция клеточного цикла в нише крайне важна, так как изменение микроокружения инициирует переход между покоящимися и циркулирующими ГСК [Khilusov I.A. et al., 2018].

Паракринное влияние ССК зависит от взаимодействия нишевых клеток, что оказывает непосредственное влияние на результат дифференцировки клеток [Rüger V.M. et al., 2018]. Как было отмечено выше, ССК являются основными регуляторами клеточного гомеостаза,

проявляющими функциональную активность посредством продукции биологически активных медиаторов (цитокины, хемокины, факторы роста) и паракринной передачи сигналов [Bernardo M.E., Fibbe W.E., 2013.].

Воздействие воспалительных медиаторов на ССК вызывает динамическое увеличение проангиогенных факторов одновременно с генерацией клеток, участвующих в неоваскуляризации [Rüger B.M. et al., 2018].

Как известно, ССК обладают противовоспалительным действием и продуцируют значительный спектр цитокинов и других медиаторов, которые оказывают регулирующее воздействие на процесс воспаления, что необходимо для поддержания гомеостатического баланса [Wu X. et al., 2013]. Таким образом, эти данные указывают на сложное функциональное взаимодействие между ССК и воспалительным микроокружением.

Большая роль в регуляции дифференцировки ССК отведена пара- и аутокринному влиянию цитокинов [Mussano F. et al., 2018]. Удивительно, но в литературе имеется очень мало данных, касательно секрета ССК. Отчеты, в которых проанализированы десять и более цитокинов и других медиаторов, крайне ограничены, кроме того, приведенные в литературе данные зачастую не систематизированы и нередко противоречат друг другу.

Известно, что остеобласты, формируя ниши для ГСК, могут контролировать их поведение с помощью межклеточных взаимодействий и паракринного воздействия факторов роста [Zhang J. et al., 2003]. Мы сформировали гипотезу о наличии искусственных (технологически созданных) микротерриторий в рельефе кальций-фосфатных покрытий, которые могут инициировать дифференцировку ССК в остеобласты [Khilusov I.A. et al., 2018]. Таким образом, особое внимание в проведенном исследовании было отведено оценке уровня продукции ССК цитокинов, хемокинов и других медиаторов, которые существенно влияют на ранние

этапы кроветворения и принимают участие в процессах самоподдержания, миграции и дифференцировки ГСК.

ГСК поддерживают гомеостаз иммунной системы в течении жизни организма и зависят от медиаторов микроокружения [Smith J.N.P. et al., 2018]. ГСК, как правило, находятся в состоянии покоя [Schuettpelz L.G. et al., 2014; Pietras E.M. et al., 2016], однако, способны быстро реагировать на воспалительные сигналы [Essers M.A.G. et al., 2009; Ehninger A. et al., 2014; Pietras E.M. et al., 2014; Pietras E.M., 2017]. Так, провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин-6 (IL6), фактор некроза опухоли- α (TNF α), интерферон- γ (IFN γ) и IFN α паракринным образом регулируют пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток и их клеток-предшественниц ГСК [Tie R. et al., 2019]. Проведенные исследования убедительно показывают роль провоспалительных медиаторов в процессе регенерации тканей [Tie R. et al., 2019; Piryani S.O. et al., 2019].

В соответствии с полученными данными, функциональная активность ССК в отношении продукции медиаторов по истечении культивирования (14 суток) в 2D монокультуре ССК, была инициирована продукцией SCF (stem cell factor, фактор стволовых клеток), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), LIF (ингибирующий лейкемию фактор leukemia inhibitory factor), и других многофункциональных цитокинов и хемокинов, регулирующих, преимущественно, функциональную активность и миграцию ГСК. Вероятно, описанный профиль продуцируемых медиаторов, с балансом факторов клеточной жизнедеятельности и индукторов клеточной гибели, может детерминировать присутствие в 2D культуре ССК на пластике популяции кроветворных клеток (таблица 15).

Процесс кроветворения тесно связан с микросредой ниши костного мозга, которая включает внеклеточный матрикс, стромальные стволовые

клетки, остеобласты и т.д. Стромальные клетки поддерживают выживание и пролиферацию клеток-предшественников [Lambert C. et al., 2016].

Гемопозз является динамическим процессом, опосредованным сигналами цитокинов; его эффективность может варьироваться в зависимости от продолжительности и величины стимуляции [Porter S.N. et al., 2016]. Эффективный гемопозз завершается формированием зрелых иммунных клеток, которые являются основными клеточными компонентами иммунной системы [Smith J.N.P. et al., 2018]. Нами было выявлено, что культивирование ССК в присутствии трехмерных матриц с кальций-фосфатным покрытием в течение 14 суток, способствовало статистически достоверному снижению (в среднем, в 2,5 раза) продукции ССК провоспалительных медиаторов, в том числе $IFN\gamma$, IL-6 и $TNF\alpha$. Воспалительные факторы являются важными регуляторами процессов пролиферации и дифференцировки клеток-предшественниц ГСК в зрелые клетки иммунной системы при стресс-индуцированном кроветворении [Tie R. et al., 2019].

Важно отметить наличие отрицательных корреляционных взаимосвязей между числом $[CD45,34,14,20]^+$ клеток с уровнем провоспалительных медиаторов (IL-6, $TNF\alpha$) ($r=-0,73$; $p<0,05$; $r=-0,79$; $p<0,05$, соответственно).

Провоспалительные медиаторы, в том числе фактор некроза опухоли- α ($TNF\alpha$), интерлейкин-6 (IL-6), интерферон- γ ($IFN\gamma$) модулируют пролиферацию и дифференцировку ГСК благодаря паракринным механизмам [Smith J.N.P. et al., 2018; Tie R. et al., 2019]. ГСК выполняют важную роль поддержания иммунных функций, зависящих от воспалительного стресса, в течение всей жизни человека, в связи с этим, описанные эффекты провоспалительных молекул на кроветворение является обоснованным [Smith J.N.P. et al., 2018].

Снижение IFN γ в трехмерной модели культивирования наблюдалось более чем в два раза ($p < 0,05$). Исследования Morales-Mantilla D.E. и King K.Y. (2018) убедительно доказали, что IFN- γ регулирует активность клеточного цикла ГСК [Morales-Mantilla D.E., King K.Y., 2018]. Отмечается, что краткосрочные эффекты передачи сигналов IFN- γ вызывают усиление пролиферативной активности ГСК, в то время как долгосрочные эффекты, напротив, истощают клеточную популяцию [Baldrige M.T. et al., 2010; Chen J. et al., 2015; Matatall K.A. et al., 2016]. Известно, что внесение IFN γ в культуру CD34⁺ клеток *in vitro* сопровождается повышением числа жизнеспособных клеток [Baldrige M.T. et al., 2011]. Также было выявлено, что IFN γ потенцирует рост гемопоэтических предшественников крови, но подавляет рост клеток, происходящих из костного мозга [Baldrige M.T. et al., 2011]. Отмечается, что повышенный уровень IFN γ отрицательно влияет на гомеостаз ГСК, способствуя дифференцировке, а не самообновлению клеток, что регулируется подавлением экспрессии генов *Gata2* и *Ets-1*, модулирующих гомеостаз ГСК. Это в конечном итоге, вызывая истощение компартмента ГСК [Morales-Mantilla D.E., King K.Y., 2018]. Таким образом, IFN γ оказывает непосредственное влияние на гомеостаз ГСК, регулируя экспрессию мРНК генов в ГСК, а также опосредованно, контролируя роли других клеточных популяций ниши [Morales-Mantilla D.E., King K.Y., 2018].

Показано, что IFN γ стимулирует ССК к секреции IL-6, который ориентирует дифференцировку миелоэритроидов в сторону миелоидных клеток [Chou D.B. et al., 2012; Schürch C.M. et al., 2014; Morales-Mantilla D.E., King K.Y., 2018].

В проведенном исследовании, по истечении 14 суток культивирования, уровень IL-6 снижался до 380,03 (286,87-505,16) пг/мл по сравнению с результатами, которые были получены при оценке контрольной 2D-модели культивирования клеток на пластике 484,83 (359,375-601,915) пг/мл ($p < 0,05$).

IL-6 представляет собой значимый цитокин, который обладает плейотропными эффектами и играет важную роль в регуляции процессов иммунной системы и процессов регенерации, в частности [Tie R. et al., 2019; Rose-John S., 2020]. Важно отметить, что IL-6 также принимает участие в эмбриональном развитии, регуляции гематопоеза, метаболизме костных тканей и других фундаментальных процессах [Hunter C.A., Jones S.A., 2015; Hasegawa H. et al., 2016; Tie R. et al., 2019].

Известно, что IL-6 инициирует иммуномодулирующие функции ССК, что приводит к усиленной передаче паракринных сигналов и пролиферации клеток [Sovkova V. et al., 2021]. Уровень TNF α оказался снижен в 1,8 раз в сравнении со значениями, которые были получены при оценке контрольных 2D-культур ($p < 0,05$).

TNF α представляет собой плюрипотентный цитокин, который активирует провоспалительные сигнальные каскады, включая путь NF- κ B в самых разных типах клеток [Chavez J.S., Pietras E.M., 2018]. Участие TNF α в регуляции жизнедеятельности ГСК на сегодняшний день остается спорной. Одна группа ученых предполагает, что TNF α снижает функциональную активность ГСК, тогда как другие исследователи считают, что действие TNF α напротив, направлено на усиление их функциональной активности [Pietras E.M., 2017]. Было показано, что увеличение уровня TNF α способствует повышению содержания активных форм кислорода (ROS), что опосредует активацию дифференцировки ГСК и истощение их нормальных клонов [Pietras E.M., 2017; Иванов П.А., 2021].

Важно отметить, что TNF α , как и IFN γ , ингибируют экспансию и инициируют апоптоз ГСК [Baldrige M.T. et al., 2011].

Клеточный апоптоз может активироваться напрямую, или опосредованно, через индукцию каспазы-1, FAS и TRAIL [Gyurkovska V., Ivanovska N., 2016; Masouridi-Levrat S. et al., 2016]. TRAIL входит в суперсемейство TNF и вступает во взаимодействие с молекулами

суперсемейства рецепторов TNF [Walsh M.C., Choi Y., 2014; Rochette L. et al., 2018]. В настоящем исследовании уровень TRAIL был более чем в 1,5 раза ниже, чем в экспериментальных 3D-культурах в сравнении с результатами, которые были получены при оценке контрольных культур ССК на пластике по истечении 14 суток культивирования ($p < 0,05$).

В работе Rochette L. et al. (2019) отмечается функциональная дуальность TRAIL, действие которого, в зависимости от уровня концентрации, может потенцировать воспаление и стимулировать индукцию апоптоза, или, напротив, способствовать сохранению жизнеспособности клеток и ингибировать воспаление [Rochette L. et al., 2019].

Важно отметить, что IL-6, подавляющий проапоптотические сигналы, не ингибирует TRAIL-индуцированный апоптоз [Tinhofer I. et al., 2006].

Выявленное нами в среде 3D монокультуры ССК повышение концентрации хемокина RANTES вызвано, вероятно, увеличением числа $[CD45,34,14,20]^+$ клеток, что подтверждает выявленная положительная корреляционная взаимосвязь между этими параметрами ($r=0,72$, $p < 0,05$). Показано, что хемокин RANTES контролирует функциональную активность гемопозитических клеток-предшественниц, в частности, клеток моноцитарного ряда [Piryani S.O. et al., 2019].

RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), также известный, как Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) является провоспалительным цитокином, который может модулировать гематопоз в гомеостатических условиях. Piryani S.O. et al. (2019) показали, что CCL5 может быть использован как фармакологический агент, ускоряющий регенерацию кроветворения [Piryani S.O. et al., 2019]. Исследования на животных моделях позволили выявить, что делеция *Ccr5* в кроветворных клетках задерживает регенерацию кроветворения [Piryani S.O. et al., 2019].

Исследование Piryani S.O. et al. (2019) убедительно доказывает, что передача RANTES является важным фактором, обеспечивающим регенерацию кроветворения [Piryani S.O. et al., 2019].

Известно, что продукция RANTES регулируется как в остеобластах, так и в остеокластах за счет повышения уровня внеклеточного Ca^{2+} в межклеточном пространстве на этапе резорбции костной ткани [Yano S. et al., 2005]. Таким образом, выявленная позитивная ассоциация между уровнем хемокина RANTES и экспрессией мРНК гена *ALPL* ($r=0,69$, $p<0,05$) в 3D-модели культивирования ССК может служить доказательством продукции исследуемого хемокина в культуре ССК остеобластами. Было показано, что ионы Ca^{2+} - важные индукторы экспрессии щелочной фосфатазы [Carlier A. et al., 2011]. Высокий уровень Ca^{2+} оказывает митогенный эффект на остеобласты [Carlier A. et al., 2011], и, следовательно, возможно, что активация RANTES потенцирует активацию пролиферации в этих клетках. Индукция секреции RANTES, опосредованная высоким содержанием Ca^{2+} в среде может быть физиологически важной, поскольку процесс резорбции кости остеокластами запускает изменения в функции остеобластов, такие как хемотаксис, которые завершаются образованием кости дифференцированными остеобластами в месте, где кость была резорбирована. Следовательно, остеокласты в ответ на высокий локальный уровень ионов Ca^{2+} , образующихся в результате их резорбтивной активности, секретируют больше RANTES, что, в свою очередь, индуцирует миграцию остеобластов [Yano S. et al., 2005].

Как было показано, продукты биodeградации КФ материалов, главным образом, ионы Ca^{2+} и неорганического фосфора, могут оказывать заметный дистантный регуляторный эффект на клетки исследуемой культуры [Шаркеев Ю.П. и др., 2014]. Ионы Ca^{2+} , выделяемые при деградации биоматериала, могут способствовать индукции дифференцировки ССК в остеобласты с помощью экспрессии кальций-связывающих белков [Tian T. et

al., 2019]. Выявленная нами в 3D-культурах ССК отрицательная взаимосвязь содержания RANTES с количеством мертвых клеток ($r=-0,78$, $p<0,05$), свидетельствует о протекторном влиянии этого хемокина на ССК. Описанный нами факт находит отражение в данных научной периодики, подтверждающих, что RANTES является молекулой, способствующей выживанию остеобластов и может функционировать как хемоаттрактант для этих клеток [Yano S. et al., 2005; Иванов П.А., 2021]. Таким образом, анализируя изменение уровня продукции культурой ССК провоспалительных медиаторов подтверждает факт, что воспаление является важной тканевой реакцией, и его продолжительность влияет на эффективность последующей регенерации ткани [Schmidt-Bleek K. et al., 2015]. Тем не менее, клетки с провоспалительным потенциалом и продуцируемые ими медиаторы не всегда необходимы для тканевой регенерации; по некоторым данным, отсутствие этих факторов может способствовать ускоренной регенерации [Kolar P. et al., 2010]. Вероятно, это связано с тем, что ССК, а также остеобласты, хондробласты и фибробласты, могут продуцировать остеогенные и провоспалительные медиаторы на протяжении 7–14 дней в процессе тканевой регенерации [Kon T. et al, 2001], что подтверждается в проведенном исследовании дистантного воздействия трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием на ССК. Важно отметить, что эффективное очищение очага регенерации и продукция цитокинов, обладающих репаративными функциями, которые направлены на восстановление гомеостаза тканей посредством устранения воспалительной среды, способствуют (нео)ангиогенезу [Loi F. et al., 2016].

На фоне снижения уровня провоспалительных медиаторов, отмечалось статистически достоверное увеличение концентрации ростовых факторов G-CSF, LIF, SCF ($p<0,05$) по истечении 14 суток культивирования в присутствии трехмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием.

Концентрация G-CSF увеличивалась в 1,6 раз по окончании 14 суток культивирования в сравнении с контрольными 2D-культурами ССК ($p < 0,05$).

G-CSF регулирует кроветворение и связан с выживанием, пролиферацией клеток-предшественников гранулоцитов, а также высвобождением мезенхимальных предшественников [Brown G., 2020].

Недавние исследования показали, что EPO, M-CSF, G-CSF и GM-CSF индуцируют сигнальный каскад и / или активируют генетическую программу, для дифференцировки ГСК только в один клеточный клон [Brown G., 2020].

Некоторые гемопоэтические цитокины контролируют выживание и пролиферацию ГСК и управляют судьбой клеточных клонов [Brown G., 2020].

Помимо очевидной роли G-CSF в гемопоэзе, нами было выявлено, что кратковременное введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) может привести к снижению количества и активности метафизарных остеобластов как в моделях человека, так и у мышей. Дальнейшие исследования показали, что уменьшение количества остеобластов может приводить к снижению экспрессии SDF-1, SCF, OPN и других белков [Christopher, M.J., & Link, D.C., 2008; Li S.-D. et al., 2017].

Продукция SCF культурой ССК в присутствии трехмерных матриц с кальций-фосфатным покрытием, увеличилась по сравнению с 2D-монокультурами ($p < 0,05$) по истечении 14 суток культивирования.

Фактор (SCF) имеет решающее значение для гемопоэтического гомеостаза. Czekanska E.M. et al. (2014) было показано, что SCF регулирует экспрессию белков, участвующих в пролиферации, хондрогенезе и регуляции экстрацеллюлярного матрикса. Это демонстрирует, что изменения секрета могут быть направлены на желаемый конечный функциональный результат, путем выбора наиболее подходящего цитокина. Более того, характер экспрессии компонентов сигнального пути Wnt предполагает

дифференциальную регуляцию этого пути с помощью IL1 β и SCF [Czekanska E.M. et al., 2014]. Показано, что SCF, продуцируемый остеобластами, важен для мобилизации ГСК [Li S.-D. et al., 2017; Иванов П.А., 2021].

Фактор ингибирования лейкемии (LIF) является наиболее плейотропным членом семейства цитокинов интерлейкина-6. Несмотря на общие с IL-6 механизмы передачи сигнала (JAK / STAT, MAPK и PI3K), между рецепторами этих двух цитокинов существуют значительные различия с точки зрения стехиометрии, состава, архитектуры и термодинамики. LIF может оказывать парадоксально противоположные эффекты в разных типах клеток, включая стимуляцию или ингибирование пролиферации, дифференцировки и выживания [Nicola N.A., Babon J.J., 2015].

Другие биологические свойства LIF включают индукцию ремоделирования костей и регуляцию кроветворения. Роль LIF в ангиогенезе полностью не выяснена, и различные исследования показали противоречивые результаты. Прямое действие LIF на эндотелиальные клетки, по-видимому, ингибирует их ангиогенную способность, в то время как действие этого фактора на популяцию стволовых клеток инициирует продукцию важных проангиогенных факторов роста клеточной культурой ССК, что способствует неоваскуляризации [Nicola N.A., Babon J.J., 2015].

Уровень LIF увеличивался в 1,4 раза при сокультивировании с трехмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении времени культивирования, по сравнению с контрольными 2D-культурами ($p < 0,05$).

Таким образом, в соответствии с полученными данными, в настоящем эксперименте показано, что SCF, G-CSF и LIF являются гемопоэтинами и потенцируют увеличение популяции ГСК, а также клеток-предшественников. Указанные изменения отмечались на фоне снижения концентрации медиаторов с проапоптотическим и провоспалительным действием в

остеобластных микротерриториях, которые образуются из ССК и очагов минерализации на пластиковой поверхности при дистантном воздействии трехмерных матриц с кальций-фосфатным покрытием в условиях культивирования *in vitro*. Описанный факт подтверждается выявленными положительными корреляционными взаимосвязями между количеством [CD45,34,14,20]⁺ уровнем гемопоэтинов – SCF, G-CSF и LIF, ($r=0,81$, $r=0,71$, $r=0,79$; $p<0,05$ во всех случаях, соответственно) в экспериментальных 3D культурах ССК.

Таким образом, в условиях экспериментального дистантного сокультивирования ССК с 3D матриксами, несущими КФ-покрытие, по истечении 14-ти сутки культивирования отмечалось окончание провоспалительной фазы, что подтверждается снижением концентрации провоспалительных (TNF α , IL-6, IFN γ) [Юрова К.А. и др., 2023] медиаторов и проапоптотических (TRAIL) факторов в культуре ССК, а также инициацией клеточной дифференцировки ССК в остеобласты (повышение экспрессии генов *RANX2*, *ALPL*, *BMP-6*). Вероятно, продукция культурой ССК провоспалительных медиаторов *in vitro*, тормозит экспрессию остеодифференцировочных генов по принципу обратной связи. Это может являться важным этапом переключения на экспрессию мРНК остеогенных генов стромальными стволовыми клетками (в том числе, *ALPL*). В условиях повышения уровня медиаторов с остеомодулирующими свойствами, а также биомолекул и гемопоэтинов, выполняющих функцию сигнальных молекул кроветворных ниш (LIF, SCF и G-CSF) [Иванов П.А., 2021], продуцируемых ССК и остеобластами, формируются микротерритории ГСК.

Также нами была предпринята попытка проанализировать особенности дистантного влияния матриц с КФ покрытием на формирование очагов минерализации межклеточного матрикса в культурах ССК с учетом изменения количества клеток с морфологией кроветворных и концентрацией остеокальцина в среде культивирования,

посредством оценки площади минерализации межклеточного матрикса, числа кроветворных клеток на пластике, вблизи экспериментальных образцов и уровнем остеокальцина в условиях 21-суточного культивирования *in vitro*.

Морфометрическая оценка клеточных культур показала увеличение площади островков минерализации в полях зрения в 3D-культурах до (2,74 (1,75 – 4,77) см² по сравнению с показателями, полученными при оценке двумерной модели культивирования. Однако в модели сравнения (2D-культура ССК с добавлением дифференцировочной среды) площадь очагов минерализации была больше и составила 3,95 (1,86 – 6,61) см² (таблица 19).

В 2D-культуре ССК в присутствии остеогенной дифференцировочной среды (2D_osteо контроль) количество клеток с морфологией кроветворных оставалось на уровне контрольной 2D-культуры. Однако в экспериментальной культуре клеток в присутствии 3D-матрикса увеличение площади островков минерализации наблюдалось на фоне увеличения содержания клеток с морфологией кроветворных (более чем в 3 раза). Кроме того, рост суммарной площади очагов минерализации имел позитивную ассоциацию с повышением числа клеток с морфологией кроветворных в 3D-монокультуре ($r=0,86$; $p<0,05$), а также положительную корреляционную взаимосвязь с уровнем остеокальцина в среде культивирования ($r=0,84$; $p<0,05$). Стоит также отметить сильную положительную корреляционную взаимосвязь количества клеток с морфологией кроветворных с уровнем остеокальцина ($r=0,90$; $p<0,05$). Корреляционная взаимосвязь между суммарной площадью очагов минерализации на пластике и количеством клеток с морфологией кроветворных в *in vitro* моделях ССК также была убедительно продемонстрирована с помощью регрессионного анализа ($r=0,86$, $p<0,05$). Выявленное повышение уровня продукции остеокальцина в условиях сокультивирования ССК с искусственным трехмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань по сравнению с 2D-

контролем, свидетельствует об индукции процессов образования экстрацеллюлярного матрикса [Gerosa L., Lombardi G., 2021].

Остеокальцин известен как специфический неколлагеновый белок, продуцируемый в межклеточное пространство на поздней стадии дифференцировки остеобластов. Высвобождение этого белка происходит после карбоксилирования, затем он включается в костный клеточный матрикс и соединяется с гидроксиапатитом [Gerosa L., Lombardi G., 2021]. Остеокальцин играет ключевую роль в минерализации кости [Carvalho M.S. et al., 2020]. Некоторые исследования демонстрируют, что остеокальцин продуцируется в микросреду и может связывать ионы кальция, обеспечивая образование кристаллов гидроксиапатита [Carvalho M.S. et al., 2019].

Неколлагеновые белки биологически активны и принимают участие в регуляции функционирования костной ткани, в том числе участвуют в процессах клеточной адгезии, дифференцировки, минерализации и резорбции / ремоделировании кости, занимая примерно десять процентов от всего объема костного внеклеточного матрикса. Остеокальцин играет решающую роль в минерализации матрикса, участвует в передаче сигналов в клетках, в частности, в резорбции и отложении костей, привлекая остеокласты и остеобласты [Zoch M.L. et al., 2016]. На клеточном уровне остеокальцин регулирует минерализацию и ангиогенез - два важных механизма регенерации костной ткани. Недостаточное количество остеокальцина приводит к нарушению следующих процессов: клеточной пролиферации, остеогенной дифференцировки, минерализации и снижает ангиогенный потенциал ССК [Carvalho M.S. et al., 2020].

Таким образом, образование участков минерализации межклеточного матрикса в культурах ССК, на фоне увеличения содержания кроветворных клеток и роста уровня остеокальцина по истечении 21 суток культивирования *in vitro*, в присутствии трехмерных имплантатов, имитирующих регенерирующую костную ткань, является логически

обоснованным завершением процессов дифференцировки культуры ССК в остеогенном направлении в 3D-модели культивирования. Таким образом, в ходе проведенного исследования было выявлено, что 14-ти дневное дистантное *in vitro* культивирование ССК с трёхмерным искусственным матриксом, несущим КФ покрытие, способствует дифференцировке клеток в остеобласты с увеличением процентного содержания $[CD45,34,14,20]^+$ клеток. Увеличение числа клеток с фенотипом гемопоэтических коррелировало с увеличением содержания в супернатантах клеточных культур гемопоэтинов (SCF, LIF, G-CSF и хемокин RANTES) и уменьшением уровня содержания медиаторов с провоспалительным (IFN γ , IL-6 и TNF α) и проапоптотическим (TRAIL) действием (рис. 17). По истечении 21-суток дистантного культивирования ССК с трёхмерным искусственным матриксом, несущим КФ покрытие, было выявлено, что увеличение числа клеток с фенотипом гемопоэтических позитивно коррелировало с повышением содержания остеокальцина в среде культивирования и с увеличенной площадью очагов минерализации клеточной культуры, что отражает дифференцировку ССК в остеобласты.

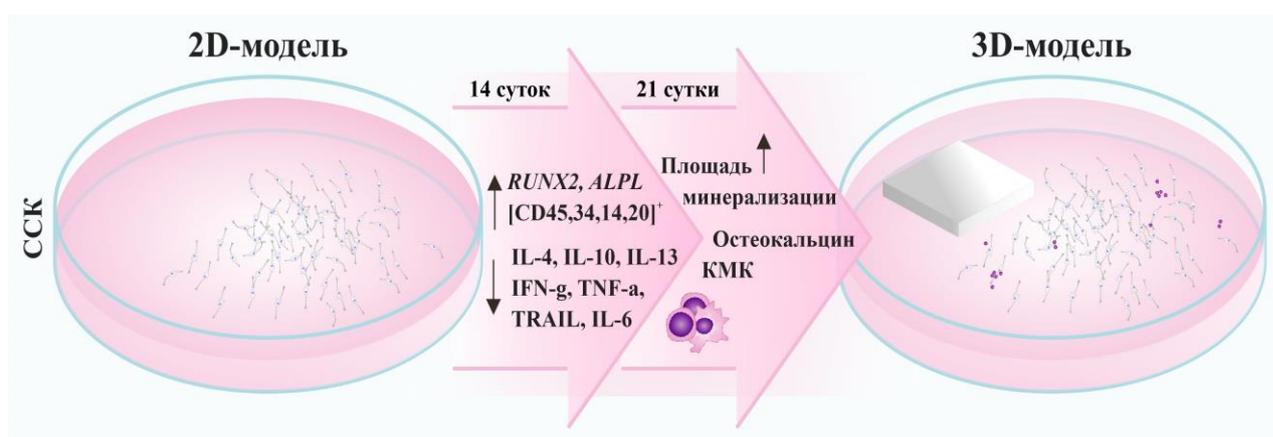


Рисунок 17. Схема гемопозеза и остеогенеза в условиях дистантного культивирования *in vitro* монокультуры стромальных стволовых клеток человека в присутствии трёхмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием.

4.3. Особенности сокультивирования стромальных стволовых и неприлипающих иммунокомпетентных клеток в присутствии трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 14 и 21 суток культивирования

Для выявления особенностей кооперативного взаимодействия культур ССК и иммунокомпетентных клеток, наиболее приближенных к условиям *in vivo*, было проведено совместное культивирование ССК и иммунокомпетентных клеток на пластике (смешанная 2D контрольная модель), а также в присутствии трехмерных матриксов с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань.

По истечении срока культивирования было выявлено, что ИК и ССК в смешанной модели культивирования показывали такой же высокий уровень жизнеспособности, как и в монокультурах.

Ниши костного мозга представляют собой специализированное микроокружение внутри костей, где поддерживающие клетки, образующие клеточную нишу, позволяют поддерживать и дифференцировать гемопоэтические и стромальные стволовые клетки (ГСК и ССК соответственно) [Granata V. et al., 2022].

Классическая концепция формирования ниш гласит о том, что ключевым условием длительного самоподдержания клеток и реализации генетической программы дифференцировки возможно в случае присутствия специфического микроокружения, которое формирует особую нишу. Формирование остеобластной ниши также обуславливает пространственная организация, роль которого в настоящем исследовании выполняет искусственный трехмерный матрикс, имитирующий регенерирующую костную ткань благодаря пористой структуре и кальций-фосфатному покрытию [Khilusov I.A. et al., 2020].

ГСК находятся в специализированных нишах, которые способствуют их поддержанию и регулируют выработку кроветворных клеток [Comazzetto S., Shen B., Morrison S.J., 2021]. Гемопoэтические клетки вне ниши не способны реализовывать свою функциональную активность. Хоминг является одним из важнейших свойств ГСК, так как обеспечивает получение необходимых сигналов для реализации программы клеточной дифференцировки [Khilusov I.A. et al., 2020].

Важно отметить, что зрелые ССК считаются одним из ключевых игроков в физиологическом ремоделировании и репарации тканей [Andreeva E. et al., 2017].

Первый этап ремоделирования кости включает обнаружение сигнала, инициирующего ремоделирование. Этот сигнал может быть инициирован различными факторами, например, прямым механическим напряжением кости. Ежедневно на скелет воздействует постоянная механическая нагрузка, и считается, что остециты модифицируют в биологические сигналы физические команды, полученные от механического воздействия, что в конечном итоге активируют процесс ремоделирования кости [Raggatt L.J., Partridge N.C., 2010]. При повреждении кости, присутствие Т-лимфоцитов крови в участке поражения инициирует контролируемую пролиферацию клеток, регулирует воспалительный процесс, что способствует эффективному восстановлению тканей [Mitchell R.N., 2004]. Т-лимфоциты играют центральную роль в инициации и поддержании воспалительных процессов. Накопление Т-лимфоцитов в очагах воспаления - одна из характерных черт хронических воспалительных заболеваний [Wu X. et al., 2013].

Взаимодействие иммунных клеток и ССК в процессе ремоделирования кости является одним из важных факторов, определяющих его успешный результат [Kovach T.K. et al., 2015].

Как уже отмечалось, регенерация костной ткани — сложный процесс с участием множества клеток, регулируемый многими факторами. Иммунные

клетки и продуцируемые ими цитокины играют решающую роль в регулировании баланса костеобразования и резорбции кости [Yang N., Liu Y., 2021].

Современные исследования демонстрируют роль иммунокомпетентных клеток в процессах дифференцировки ССК [Khilusov I.A. et al., 2020]. Соотношения популяций CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов, в смешанных культурах превышало значения, полученные при оценке монокультур Т-клеток по истечении 14 суток культивирования.

Специфические субпопуляции Т-клеток по-разному регулируют остеогенную дифференцировку человеческих ССК *in vitro*. Например, кондиционированная среда от культуры CD4⁺ Т-клеток человека повышает экспрессию *Runx2*, остеокальцина и *ALPL*, а также увеличивает минерализацию в остеогенных культурах ССК [Li J. et al., 2018].

Роль клеток Th1 и Th2 в регенерации кости остается спорной. Показано, что IFN γ и IL-4, продуцируемые клетками Th1 и Th2, ингибируют дифференцировку остеокластов и способствуют формированию костей путем деградации фактора β , ассоциированного с рецептором TNF (TRAF-6). Предыдущие исследования показали, что клетки Th1 являются основным источником RANKL. Клетки Th1 в основном способствуют дифференцировке клеток-предшественников остеокластов и активируют функцию остеокластов посредством TNF α , что косвенно ведет к абсорбции и разрушению костной ткани. Кроме того, в условиях дефицита эстрогена или при воспалении, доминирует остеокластогенный эффект клеток Th1 [Yang N., Liu Y., 2021].

Оценка маркеров ранней и поздней пролиферации в смешанных моделях культивирования показала статистически достоверное снижение уровня клеток, экспрессирующих на своей мембране маркеры CD25 и CD71 (при оценке монокультур Т-лимфоцитов по истечении 14 суток культивирования), тогда как уровень активированных CD3⁺ клеток (как с

фенотипом CD95, так и с фенотипом CD45RO⁺/CD45RA⁺) достоверно повышался в моделях 2D- и 3D-сокультивирования иммунокомпетентных клеток и ССК. В более ранних исследованиях было показано, что ССК способны подавлять пролиферацию Т-клеток, что подтверждается в научной периодике [Aggarwal S., Pittenger M.F., 2005].

Полученные результаты изменения фенотипического профиля иммунокомпетентных клеток подтверждены данными, полученными при оценке относительного уровня экспрессии мРНК дифференцировочных генов Т-клеток по истечении 14 суток культивирования (таблица 15). Известно, что ССК является дирижером адаптивных иммунных ответов, регулируя функциональную активность посредством изменения клеточного микроокружения иммунокомпетентных клеток, а также способствуют формированию иммунологической памяти [Bernardo M.E., Fibbe W.E., 2013]. Подавление воспаления в костном мозге является малоизученным элементом нишевой биологии, который может играть важную роль в сохранении ГСК во время старения и после заражения патогеном [Comazzetto S., Shen B., Morrison S.J., 2021].

Адаптивный иммунный ответ имеет важное значение во время позднего ремоделирования кости. Как часть адаптивного иммунного ответа, Т-клетки и их провоспалительные цитокины играют важную роль в регулировании процесса регенерации кости. Присутствие провоспалительных медиаторов в микроокружении необходимо для анаболической микросреды, поддерживающей формирование и восстановление костей [Yang N., Liu Y., 2021].

Совместное культивирование ССК жировой ткани и иммунокомпетентных клеток крови характеризовались значительным увеличением секреции биологически активных медиаторов - цитокинов, факторов роста, ангиогенных молекул и остеомодулирующих молекул, по сравнению с контрольными монокультурами. Цитокины и хемокины

являются важными регуляторами адаптивных реакций являются растворимые биологически активные молекулы [Kozłowska U. et al., 2019].

Иммунорегуляция - важнейшая способность ССК, что делает их особенными клетками, которые влияют не только на иммунные клетки, но и на клеточную нишу во время регенерации [Kozłowska U. et al., 2019].

Показано, что Т-клетки тесно связаны с процессом отложения коллагена I типа остеобластами, определяя, таким образом, структуру новообразованной костной ткани [Bucher С.Н. et al., 2019]. Остеобласт можно считать анаболической частью клеточной триады. Остеобласты откладывают недавно синтезированный внеклеточный матрикс, называемый остеоидом, состоящий в основном из коллагена типа I, протеогликанов и воды. Только после того, как остеоид минерализуется кристаллами гидроксиапатита, он приобретает стабильность, необходимую для нормальной рабочей нагрузки [Guder С. et al., 2020].

Изменение цитокинового профиля микроокружения ССК также зависит от присутствия иммунокомпетентных клеток [Khlusov I.A. et al., 2020].

При *in vitro* моделировании инфильтрации Т-клеток из крови в ткани, отмечен всплеск секреторной активности смешанной культуры стромальных клеток и лейкоцитов крови, что лежит в основе воспалительных и регенераторных процессов.

Анализ смешанной культуры ССК и иммунокомпетентных клеток в присутствии трехмерных матриксов, имитирующих регенерирующую костную ткань, позволил выявить резкое повышение продукции всего спектра изучаемых цитокинов [Comazzetto S. et al., 2021].

Воздействие провоспалительных цитокинов описано в литературе неоднозначно. Существуют противоречивые результаты относительно положительного/ отрицательного влияния цитокинов, в т.ч. TNF α и IFN γ , на дифференцировку остеобластов. Интересным фактом является то, что

провоспалительный цитокин IL-6 может индуцировать остеогенез через сигнальный путь онкостатина М (OSM)-STAT3, что позволяет предположить, что воспалительная реакция на определенном уровне может инициировать дифференцировку остеобластов [Xiao L., Xiao Y., 2019].

По результатам исследования смешанной двумерной (2D) культуры ССК и иммунокомпетентных клеток на пластике было выявлено достоверное увеличение уровня многих исследуемых цитокинов, по сравнению с 2D-культурой Т-клеток ($p < 0,05$) (табл. 12, 13, 14, 15). По сравнению с 2D-культурой ССК было выявлено достоверное увеличение концентрации следующих факторов: IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, G-CSF, TNF α ($p < 0,05$).

Спектр цитокинов, определяемых в смешанной культуре, способствовал снижению числа Т-клеток, экспрессирующих на своей мембране молекулы ранней (CD25) и поздней (CD71) активации, увеличивая содержание дубль позитивных лейкоцитов. На наш взгляд, увеличение содержания Т-клеток памяти в смешанной культуре обусловлено увеличением транскрипции мРНК гена *U2AF26*, что подтверждено позитивной корреляционной взаимосвязью ($r = 0,67$; $p < 0,05$) между указанными показателями. При этом транскрипция мРНК гена *Gfi1* оставалась на уровне значений, полученных при оценке монокультур иммунокомпетентных клеток.

Согласно данным литературы, провоспалительные (частности, TNF α , IL-1, IL-8, RANTES, MCP-1 и MIP-1 α) и ангиогенные (в частности, bFGF, PDGF, VEGF) молекулы продуцировались в монокультурах и смешанных культурах; эти сигналы опосредуют мобилизацию и последующий хоминг ССК [Yagi H. et al., 2010; Ito H., 2011; Khlusov I.A., 2020]. Yagi H. et al. (2010) было показано, что иммунокомпетентные клетки крови способствовали инвазии ССК через стенку модельного сосуда, что подчеркивает важность хемотаксического градиента, индуцируемого Т-лимфоцитами, для привлечения ССК к очагу регенерации [Yagi H. et al., 2010; Ito H., 2011].

Важно отметить, что изменения в уровне продукции исследуемых медиаторов (преимущественно) статистически значимо не изменяются при сравнении 2D- и 3D-смешанных культур, что свидетельствует о вкладе совместного культивирования ССК и иммунокомпетентных клеток, тогда как ионы кальция, диффундирующие в культуральную среду из кальций-фосфатного покрытия трехмерного матрикса, влияют, преимущественно, на культуру ССК [Trebak M., Kinet J.-P., 2019].

Кость хранит более 99% кальция в организме, который, высвобождаясь в результате резорбции кости, опосредует последующий остеогенез. Таким образом, ожидается, что клетки костного мозга реагируют на изменение градиента концентрации ионов Ca^{2+} во время ремоделирования кости. Было показано, что ионы Ca^{2+} играют значительную роль в поддержании фенотипических ГСК *in vitro* [Zhang H. et al., 2023].

Таким образом, кальций является важным регулятором различных процессов, таких как транскрипция генов, пролиферация, подвижность клеток, передача сигналов в клетках и аутофагия [Sukumaran P. et al., 2021]. Ионы кальция - известный модулятор клеточной активности [Scadden D.T., 2007; Theman T.A., Collins M.T., 2009]. Способность клеток к миграции посредством актомиозинового механизма [Mempel T.R. et al., 2004] подразумевает возможность 3D-матрикса осуществлять свое влияние на геном [Ratner B.D. et al., 2004] через цитоскелет. Кроме того, наличие естественного электростатического заряда на использованных подложках [Хлусов И.А.в и др., 2011] не исключает изменение мембранного потенциала клеток, влияющего, прежде всего, на внутриклеточные сигнальные пути [Sundelacruz S. et al., 2008].

Существенным моментом аутофагии в остеогенезе является ее участие в дифференцировке и минерализации остеобластов, особенно роль аутофагосомы во внеклеточном транспорте кальция. Модулирующая особенность аутофагии как в иммунной, так и в скелетной системах

предполагает ее решающую роль в остеоиммунологии. Кроме того, аутофагия также участвует в поддержании ниши гемопоэтических стволовых клеток костного мозга [Xiao L., Xiao Y., 2019].

Аутофагия определяется как доставка цитоплазматического материала в лизосому в клетках животных.

Более того, аутофагия способствует выживанию клеток в ответ на стрессовые условия, такие как лишение питания и гипоксия [Xiao L., Xiao Y., 2019].

Ограничение в питательных веществах способствует накоплению Т-клеток памяти в костном мозге [Comazzetto S. et al., 2021], что подтверждается в настоящем исследовании.

Уровень кислорода в тканях *in vivo* намного ниже окружающего уровня 20 % O₂, используемого в экспериментах *in vitro*, и рассматривается как так называемая «физиологическая» гипоксия. Уровень тканевого O₂ существенно варьирует, составляя в среднем около 5 % O₂ в периваскулярных нишах [Gornostaeva A.N. et al., 2020].

Аутофагия облегчает «переработку» клеточных компонентов и, следовательно, обеспечивает энергией клетки, нуждающиеся в питательных веществах. Аутофагия необходима для дифференцировки остеокластов и остеобластов [Shapiro I.M. et al., 2014]; между тем, он участвует в поляризации/функции иммунных клеток и, следовательно, регулирует иммунный ответ [Deretic V., Saitoh T., Akira S., 2013], что указывает на сложную и довольно интригующую роль в остеоиммунологии.

Как было отмечено выше, кость состоит из клеточных компонентов, таких как остеокласты, остеобласты и остециты, а также коллагена, остеоида и неорганических минеральных отложений [Kini U., Nandeesh B., 2012]. Остеокласты и остеобласты играют основную роль в ремоделировании кости [Xiao L., Xiao Y., 2019]. Остеокласты, происходящие из ГСК, считаются основным типом клеток, ответственным за резорбцию кости [Kini

U, Nandeesh B., 2012]. Предшественники остеокластов, происходящие из макрофагально-моноцитарной линии, сливаются друг с другом, образуя гигантскую многоядерную клетку — остеокласт. С другой стороны, остеобласт, происходящий из ССК, является основной клеткой формирования кости, которая строит остеоидный матрикс, и в конечном итоге, дифференцируется в остециты, наиболее распространенный тип клеток в кости. Тот факт, что остеокластогенез зависит от остеобластного рецептора-активатора лиганда ядерного фактора каппа В (RANKL), предполагает «связь» между остеокластами и остеобластами, таким образом связывая остеокластогенез с остеогенезом [Xiao L., Xiao Y., 2019].

Аутофагия уже давно считается необходимой частью клеточной дифференцировки [Xiao L., Xiao Y., 2019]. В недавнем исследовании, индуцированная аутофагия была обнаружена во время дифференцировки и минерализации остеобластов *in vitro*; аутофагосомы действуют как грузы для транспортировки внутриклеточных минеральных кристаллоподобных структур, способствующих внеклеточной минерализации [Nollet M. et al., 2014]. Ингибирование аутофагии может привести к нарушению минерализации *in vitro* и уменьшению костной массы/объема *in vivo*, за которым обычно следует индуцированный окислительный стресс и выработка RANKL. Эти результаты подтверждают фундаментальную роль аутофагии во время дифференциации и минерализации остеобластов, которая служит средством минерализации, защищает остеобласты от повышенного окислительного стресса и, более того, снижает выработку RANKL, происходящего остеобластами, и тем самым ингибирует остеокластогенез во время формирования кости [Nollet M. Et al., 2014].

RUNX2 и BGP являются типичными маркерами функционирования остеобластов и играют важную роль в остеогенезе [Satokata I. et al., 2000]. На ранней стадии избыточная экспрессия RUNX2 способна усилить дифференцировку ССК в направлении остеогенной. Кроме того, RUNX2

является основной мишенью BMP-зависимого пути и деградирует путем медиации пути убиквитинирования. В отличие от *RUNX2*, остеокальцин является маркером остеобластной дифференцировки на поздней стадии [Wu S. et al., 2018]. В проведенных ранее исследованиях было выявлено повышение секреции остеокальцина при сокультивировании ССК с искусственным трехмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань по сравнению с 2D-культурами [Litvinova L.S. et al., 2017], что согласуется с данными настоящего эксперимента.

Из семейства белков BMPs, BMP2, BMP6 показали наиболее сильную активность в отношении остеодифференцировки [Beederman M. et al., 2013]. Морфогенетический белок костей-2 (BMP2), известный как фактор регенерации кости из-за особенно сильной остеоиндуктивной функции, играет важную роль в формировании костной ткани. Накопленные сведения убедительно доказывают, что BMP2 участвует в дифференцировке остеобластов, костном ремоделировании и формировании кости, путем повышения содержания остеокальцина и фосфата, снижения содержания кальция, инициируя образование минералов и способствуя увеличению активности ALP [Wu S. et al., 2018]. Hrubí E. и коллегами (2018) было продемонстрировано, что уровень экспрессии эндогенного BMP2 имеет позитивную ассоциацию с активизацией фермента щелочной фосфатазы, что можно объяснить увеличением концентрации внеклеточного неорганического фосфата, способного проникать в клетку. В свою очередь неорганический фосфат может инициировать передачу сигналов через ERK и цАМФ / протеинкиназу, а активация этих сигнальных путей увеличивает экспрессию BMP-2 [Hrubí E. et al., 2018].

BMP6 обладает сходными функциями с BMP2, индуцируя усиленную остеодифференцировку, увеличивая активность щелочной фосфатазы, инициируя матричную минерализацию и индуцируя экспрессию мРНК остеодифференцировочных генов. Путь BMP (костный морфогенный белок)

способен усиливать активность и дифференцировку ОВ путем активации *Runx2*. После связывания с рецептором BMP (BMP-R) молекулы вызывают димеризацию BMP-R и последующее фосфорилирование белков Smad. После фосфорилирования эти молекулы активируют *Runx2* [Guder C. et al., 2020].

Повышение уровня относительной экспрессии мРНК гена *ALP* в 3D-культурах приводит к появлению в межклеточном пространстве неорганических фосфатов в свободной форме, которые при взаимодействии с ионами кальция формируют минеральный гидроксипатит в костной ткани. Таким образом, полученные результаты подтверждают проведенные исследования, результаты которых свидетельствуют о том, что повышение уровня относительной экспрессии мРНК гена *ALP* является предиктором минерализации образующейся ткани [Faia-Torres A.V. et al., 2014].

Таким образом, увеличение уровня относительной экспрессии мРНК основных остеодифференцировочных генов (*RUNX2*, *BMP2*, *BGP*, *ALP*, *SMURF*) в смешанной культуре, на фоне увеличенной минерализации межклеточного матрикса и секреции остеокальцина, при сокультивировании ССК с иммунокомпетентными клетками в присутствии искусственных матриксов, являются убедительным доказательством того, что индекс шероховатости $Ra = 2 - 3$ мкм стимулирует остеогенез в условиях дистантного взаимодействия, что, вероятно, обусловлено оптимальными условиями биodeградации поверхности искусственного матрикса для ССК.

Окрашивание ализариновым красным на 21 сутки культивирования выявило значительный рост очагов минерализации в смешанной культуре иммунокомпетентных клеток и ССК в присутствии трехмерных имплантатов, имитирующих регенерирующую костную ткань по сравнению с данными, полученными при оценке смешанной культуры на пластике (рис. 18).

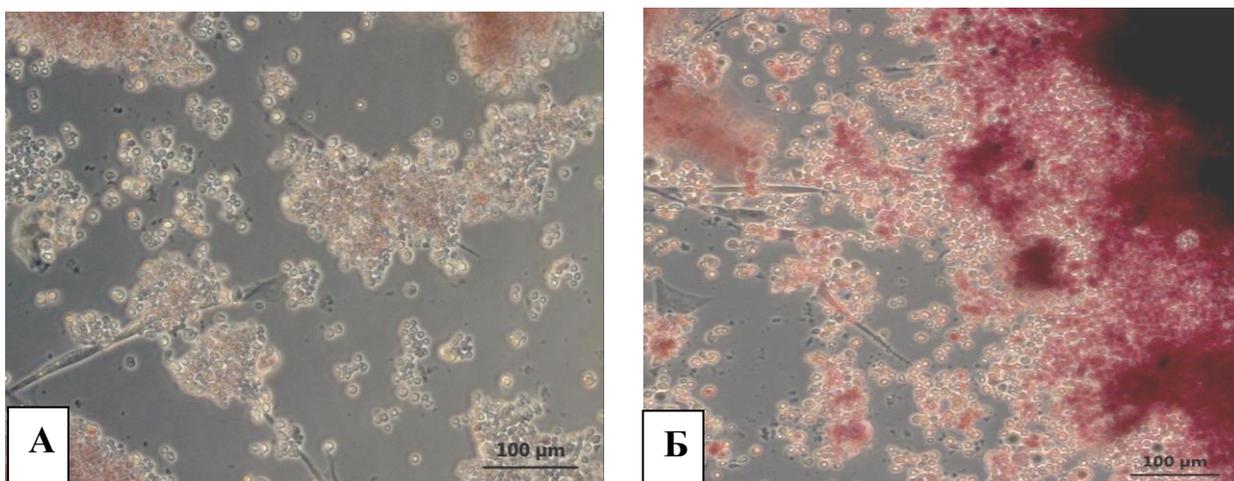


Рисунок 18. Состояние смешанной 2D-культуры (А) и 3D-культуры (Б) стромальные стволовые клетки + неприлипающие иммунокомпетентные клетки. Окраска ализариновым красным. Линейка - 100 мкм

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что физические свойства материалов участвуют в управлении судьбой стволовых клеток, поэтому шероховатость трехмерного матрикса оказывает влияние на дифференцировку клеточной культуры не только при контактном взаимодействии с искусственным трехмерным матриксом, но и в условиях дистантного взаимодействия за счет деградации кальций-фосфатного покрытия и высвобождения ионов.

Непрямой контакт клеток с трехмерными матриксами с кальций-фосфатным покрытием в течение 14 суток через продукты потенциальной биodeградации способствовал изменению фенотипических признаков ССК. Увеличение уровня относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *SMURF*, *RUNX2*, *BGLAP*) происходило на фоне достоверного увеличения числа клеток с морфологией кроветворных в 2D- и 3D- смешанных культурах.

Биоинформатические исследования последних лет показали, что остеогенез ССК сопровождается усилением экспрессии генов, задействованных в организации внеклеточного матрикса, оссификацией,

отрицательной регуляцией пролиферации клеток, развитием сосудистой сети [Fan T. et al., 2020].

При оценке смешанных культур иммунокомпетентных клеток и ССК отмечалось значительное увеличение клеток (более чем в 15 раз), несущих маркеры гемопоэтических [CD45⁺,34⁺,14⁺,20⁺]. Корреляционный анализ выявил сильную связь убывали доли CD105⁺ клеток ($r = - 0.91$; $p < 0,05$), а также увеличения доли [CD45, CD34, CD14, CD20]⁺ -элементов ($r = 0.80$; $p < 0,05$) с ростом индекса шероховатости (Ra) КФ покрытий.

Остеобласты являются критическими регуляторами судьбы ГСК в нише костного мозга [Asada N, Katayama Y., 2014]. Эти клетки находятся в непосредственной близости от ГСК; более того, регуляторные факторы, которые усиливают дифференцировку ССК в линию остеобластов, могут также способствовать развитию ниш костного мозга [Reagan M.R., Rosen C.J., 2016].

Исследования подтвердили значимость остеобластов для кроветворной системы. В 2003 году было отмечено, что количество остеобластов тесно связано с количеством ГСК, и, кроме того, абляция остеобластов напрямую приводит к уменьшению количества ГСК. Остеобласты секретируют такие факторы, как N-кадгерин, ангиопоэтин-1, тромбопоэтин и остеопоэтин, чтобы регулировать размер пула ГСК и способны контролировать миграцию ГСК [Guder C. et al., 2020]. Таким образом, поддержание ГСК зависит от внешних сигналов микроокружения костного мозга [Ramalingam P. et al., 2021].

В нишах предусмотрено множество поддерживающих факторов. Регуляторная роль ССК КМ по отношению к ГСК была продемонстрирована в экспериментах на генетически модифицированных мышцах. В частности, удаление CXCL12 или SCF из всех ССК приводило к истощению популяции ГСК [Kandarakov O. et al., 2022].

Недавние исследования показали, что ключевые нишевые факторы SCF и CXCL12 могут модулироваться передачей сигналов Caspase3/NLRP3, что расширяет понимание регуляторных механизмов, влияющих на гемопоэз. Следует отметить, что один и тот же молекулярный сигнал, представленный различными клетками в нишах костного мозга, может выполнять разные функции в каждом компартменте.

С другой стороны, один и тот же фактор может вызывать разные эффекты на гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники [Granata V. et al., 2022].

Интересно отметить, что широко представленная в перисинусоидальной нише популяция ССК с высокой экспрессией CXCL12, SCF и LEPR (клетки CAR) обладает высокой экспрессией адипогенных и остеогенных факторов, таких как PPAR γ , Runx, а также способностью к дифференцировке в остеобласты и адипоциты [Seike M. et al., 2018; Kandarakov O. et al., 2022]. Кратковременная абляция клеток CAR у мышей приводила к уменьшению популяции ГСК в нише, что было связано со снижением продукции CXCL12 и SCF [Kandarakov O. et al., 2022].

Кроме того, эффекты SCF [He N. et al., 2014] ориентированы на процесс ремоделирования матрикса кости и формирование микротерриторий для ГСК.

Микроокружение ГСК в костном мозге, называемое нишей, обеспечивает гемопоэтический гомеостаз путем контроля пролиферации, самообновления, дифференцировки и миграции ГСК и клеток-предшественников в устойчивом состоянии. Регуляторные сигналы ниши могут быть в форме связанных с клеткой или секретлируемых факторов и других местных физических сигналов [Pinho S., Frenette P.S., 2019].

Показано, что провоспалительные цитокины, в том числе IL-6, TNF α , IFN γ , IFN α посредством паракринного взаимодействия, также участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки ГСК и их клеток-

предшественниц [Porter S.N. et al., 2016; Smith J.N.P. et al., 2018; Tie R. et al., 2019]. Чувствительность ГСК к указанным цитокинам объясняется тем фактом, что клетки реализуют иммунные функции в течение всей жизни человека, и зависимы от воспалительного стресса [Takizawa H. et al., 2012; Smith J.N.P. et al., 2018]. Проведенные исследования также доказывают роль провоспалительных медиаторов в процессе тканевой регенерации [Tie R. et al., 2019; Piryani S.O. et al., 2019; Иванов П.А., 2021].

Для поддержания гемопозитического гомеостаза важно строго контролировать равновесие между дифференцировкой и самообновлением: чрезмерная дифференцировка или недостаточное самообновление истощают пул ГСК, тогда как неэффективная дифференцировка или запредельное самообновление способствуют развитию миелопролиферативных заболеваний. Жизнедеятельность ГСК регулируется взаимодействиями транскрипционных и эпигенетических факторов, а также влиянием гуморальных факторов и воздействием локальных сигналов ниши стволовых клеток [Pinho S., Frenette P.S., 2019].

Таким образом, трехмерные матриксы с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим поверхность минерального матрикса регенерирующей костной ткани, способствуют регенерации костной ткани, посредством усиления функциональной (секреторной) активности смешанной культуры стромальных стволовых клеток и Т-лимфоцитов крови. В ходе проведенного исследования было показано, что 14-ти дневное дистантное *in vitro* сокультивирование ССК с Т-клетками в присутствии трёхмерного титанового матрикса с кальций-фосфатным покрытием способствует формированию специализированных микротерриторий со специфическим микроокружением, регулирующих дифференцировку ССК в остеобласты.

Культивирование иммунокомпетентных клеток совместно с ССК характеризовалось резким увеличением продукции всего спектра изучаемых

медиаторов - цитокинов, факторов роста, ангиогенных молекул и остеомодулирующих молекул по сравнению с контрольными монокультурами (рис. 19).

Спектр цитокинов, определяемых в смешанной культуре, способствовал снижению числа Т-клеток, экспрессирующих на своей мембране маркеры ранней (CD25) и поздней (CD71) активации, увеличивая содержание дубль позитивных лейкоцитов. Оценка смешанных культур иммунокомпетентных клеток и ССК показала значительное увеличение клеток (более чем в 15 раз), несущих маркеры гемопоэтических [CD45,34,14,20]⁺ на 14 сутки культивирования. По истечении 21 суток культивирования отмечалось увеличение очагов минерализации в смешанной культуре иммунокомпетентных клеток и ССК в присутствии трехмерных имплантатов, имитирующих регенерирующую костную ткань по сравнению с данными, полученными при оценке смешанной культуры на пластике (рис. 19).

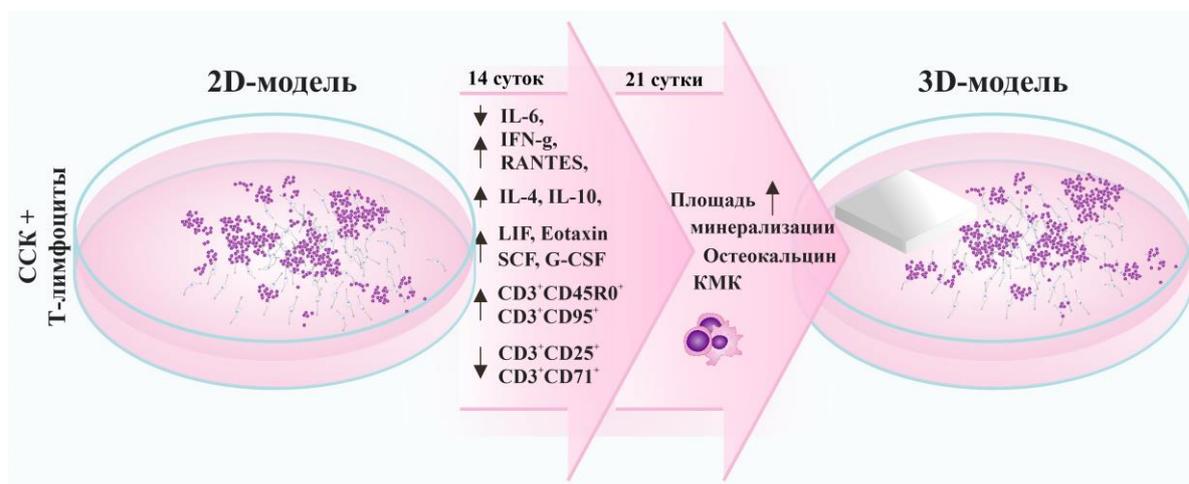


Рисунок 19. Особенности кооперативного взаимодействия стромальных стволовых и неприлипающих иммунокомпетентных клеток в присутствии трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 14 и 21 суток культивирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами экспериментальное моделирование кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток *in vitro* в условиях дистантного сокультивирования *in vitro* иммунокомпетентных клеток и стромальных стволовых клеток (ССК) человека в присутствии трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, позволило получить новые фундаментальные знания в области физиологии ремоделирования костной ткани.

Особенности жизнедеятельности иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток человека в условиях культивирования в 3D-культуре, приближенной к условиям функционирования лимфоцитов *in situ*, отличаются от стандартной суспензионной 2D-культуры на пластике по активности генов и рецепторному профилю.

Нами было установлено, что трехмерный матрикс с кальций-фосфатным покрытием, является неспецифическим активатором (без участия TCR), оказывает влияние на функциональную активность иммунокомпетентных клеток в условиях дистантного взаимодействия по истечении 48 часов культивирования, действуя опосредованно, через цитокиновую сеть (посредством ауто- и паракринных механизмов взаимодействия) и инициирует активацию и пролиферацию иммунокомпетентных клеток. Также в 3D-модели культивирования отмечался рост числа CD45R0⁺ лимфоцитов и дубль позитивных изоформ [CD45R0⁺/CD45RA⁺] клеток, что свидетельствует о клеточной дифференцировке наивных Т-клеток в Т-клетки иммунологической памяти (рис. 20).

Совместное культивирование иммунокомпетентных клеток с ССК в 3D-культуре показало, что спектр цитокинов способствовал снижению числа Т-клеток, несущих на своей поверхности маркеры ранней (CD25) и поздней (CD71) активации, что потенцирует увеличением числа дубль позитивных

лейкоцитов. Используемая нами модель дистантного сокультивирования иммунокомпетентных клеток со стромальными стволовыми клетками в присутствии с трёхмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, имитирующая прообраз системы "кость/костный мозг", показала, что по истечении 14-ти суток культивирования ССК дифференцируется в остеобласты с одновременным увеличением процентного содержания [CD45,34,14,20]⁺ клеток на фоне повышения продукции гемопоэтических факторов роста (SCF, LIF, G-CSF и хемокина RANTES) и уменьшения уровня провоспалительных цитокинов (IL-6, IFN γ , TNF α , TRAIL) в супернатантах клеточных культур. В 21-дневной 3D-культуре отмечалось, что увеличение количества клеток с фенотипом гемопоэтических позитивно коррелирует с ростом уровня остеокальцина и увеличением суммарной площади очагов минерализации клеточной культуры, что отражает дифференцировку ССК в остеобласты (рис. 20).

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что физические свойства материалов участвуют в управлении судьбой стволовых клеток, поэтому шероховатость трехмерного матрикса оказывает влияние на дифференцировку клеточной культуры не только при контактном взаимодействии с искусственным трехмерным матриксом, но и в условиях дистантного взаимодействия за счет деградации кальций-фосфатного покрытия и высвобождения ионов Ca²⁺.

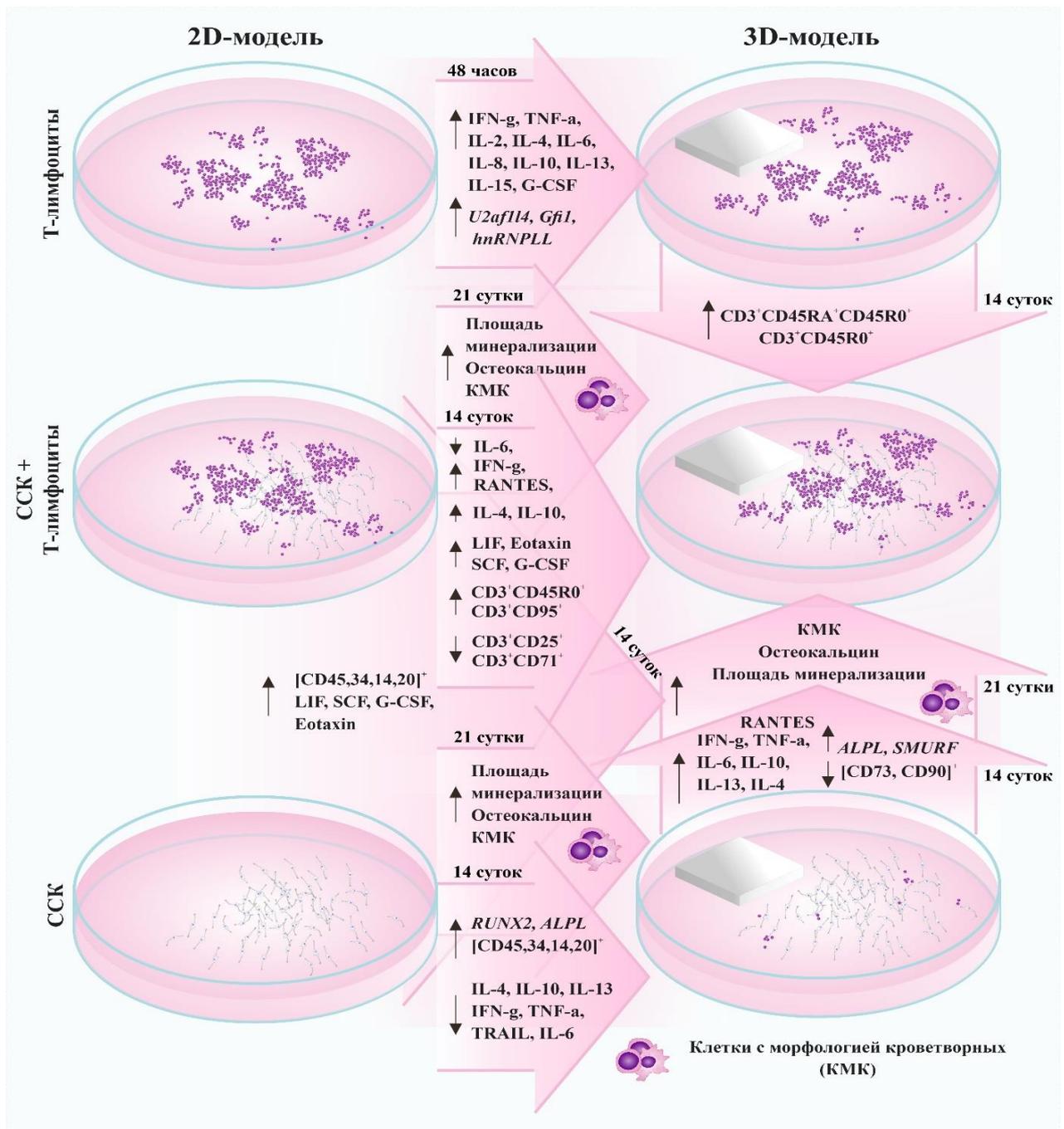


Рисунок 20. Клеточные и молекулярные аспекты, определяющие формирование эффективной кооперации стромальных стволовых и неприлипающих иммунных клеток крови человека на *in vitro* модели регенерации костной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Культивирование (в течение 48 ч) иммунокомпетентных клеток с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием, используемого в качестве физиологического раздражителя не антигенной природы, способствует индукции пролиферативного ответа клеток, повышению секреции (в сравнении с 2D-моделью – 48 ч инкубации) молекул с провоспалительным и регенераторным потенциалом (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IFN γ , TNF α , G-CSF), росту экспрессии мРНК генов дифференцировки и созревания (*hnRNPLL*, *U2af1l4*, *Gfi1*) Т-лимфоцитов, формируя модель антиген-независимой активации иммунокомпетентных клеток на 3D-границе раздела клетка/поверхность регенерирующей кости.
2. Сокультивирование иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток в условиях дистантной 3D-модели (в течение 14 суток), способствует достоверному (по сравнению со смешанной 2D-моделью) снижению числа CD3⁺ клеток, несущих на своей поверхности маркеры ранней (CD25) и поздней (CD71) активации, при увеличении содержания клеток, экспрессирующих на своей мембране молекулы созревания (CD95) и дифференцировки (CD45R0).
3. В смешанной экспериментальной модели культивирования (на 14 сутки) добавление трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием потенцирует выраженную в большей степени, чем в 3D-монокультурах иммунокомпетентных клеток, дифференцировку наивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD45RA⁺) в Т-клетки иммунной памяти (CD3⁺CD45R0⁺) и образование переходных, дубль-позитивных форм клеток (CD3⁺CD45RA⁺CD45R0⁺).
4. В 3D-модели дистантного сокультивирования (14-дневное культивирование) стромальных стволовых клеток в формате

монокультур, повышение (в сравнении с 2D-монокультурой) экспрессии генов остеодифференцировки (*RUNX2* и *ALPL*) позитивно коррелирует с ростом числа [CD45,34,14,20]⁺ клеток, на фоне снижения содержания про- (IFN γ , TNF α , TRAIL и IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10 и IL-13) молекул и, напротив, увеличения хемокина RANTES в среде культивирования.

5. Сокультивирование иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток в условиях дистантной 3D-модели (в течение 14 суток), сопровождается достоверным (в сравнении с 3D-монокультурой) увеличением секреции клетками смешанной культуры молекул с провоспалительным (IFN γ , TNF α и IL-6) и противовоспалительным (IL-4, IL-10 и IL-13) действием и хемокина RANTES.
6. В 14-дневной 3D-монокультуре стромальных стволовых клеток, а также в смешанной 3D-модели культивирования, повышение (в сравнении с 2D-моделями) уровня гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF и Eotaxin) в среде культивирования, потенцирует увеличение числа [CD45,34,14,20]⁺ клеток, выраженное в большей степени, в смешанной 3D-модели.
7. 3D-модель дистантного сокультивирования (14-дневное культивирование) иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток в смешанном формате, способствует более эффективной дифференцировке последних (в сравнении с 3D-монокультурой) в остеогенном направлении, что характеризуется достоверным снижением числа [CD73,CD90]⁺ клеток, негативно коррелирующим с ростом экспрессии генов остеодифференцировки - *ALPL* и *SMURF*.
8. Увеличение площади **участков** минерализации внеклеточного матрикса, выраженное в большей степени в 3D-смешанных культурах (в сравнении с 3D-монокультурами стромальных стволовых клеток) по истечении 21-суточного культивирования, положительно коррелирует с

повышением уровня остеокальцина в супернатантах клеточных культур и ростом числа клеток с морфологическими признаками кроветворных, идентифицируемых на пластике около образцов/матриков.

9. Формирование микроокружения костномозговых лакун, посредством ауто- и паракринных механизмов активной гуморальной и межклеточной кооперации иммунокомпетентных и стромальных стволовых клеток человека, потенцирует последние образовывать минерализованный костный матрикс, как тканевый элемент гемопозиндуцирующего микроокружения, что может являться прототипом системы "кость/костный мозг" в условиях *in vitro*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ 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. Биоконпозиты на основе кальцийфосфатных покрытий, наноструктурных и ультрамелкозернистых биоинертных металлов, их биосовместимость и биодеградация / Ю.П. Шаркеев, С.Г. Псахье, Е.В. Легостаева и др. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2014. – 596 с.
3. Взаимовлияние ММСК и моноклеарных клеток крови при сокультивировании *in vitro* в присутствии трехмерного искусственного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань / К.А. Юрова, И.К. Норкин, О.Г. Хазиахматова и др. // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 443-448.
4. Влияние физических, химических и биологических манипуляций на поверхностный потенциал кальцийфосфатных покрытий на металлических подложках / И.А. Хлусовб, В.Ф. Пичугин, Э.А. Гостищев и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 3. – С. 72–81.
5. Динамическая теория регуляции кроветворения / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.В. Жданов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т. 127, № 5. – С. 484–494.
6. Иванов, П.А. Функционирование мезенхимных стромальных/стволовых клеток в условиях *in vitro* моделирования системы "регенерирующая кость/ кроветворное микроокружение"

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / П.А. Иванов. – Томск, 2021. – 119 с.

7. К вопросу о фибробластоподобных клетках в периферической крови человека / И.А. Хлусов, К.А. Нечаев, Н.М. Шевцова и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 4. – С. 72–78.
8. 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. – V. VI, № 2. – Р. 55–64.
9. Коршунов, Д. А. Современные достижения и проблемы в исследовании культур клеток / Д.А. Коршунов, И.В. Кондакова // Успехи современной биологии. – 2016. – Т. 136, №4. – С. 347–361.
10. Луговская, С.А. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов / С.А. Луговская, М.Е. Почтарь, Н.Н. Тупицин. – Тверь: Триада, 2005. – 166 с.
11. Мезенхимные стволовые клетки: краткий обзор классических представлений и новых факторов остеогенной дифференцировки / К.А. Юрова, Е.С. Мелашенко, О.Г. Хазиахматова др. // Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23, № 2. – С. 207-222.
12. 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.
13. Риггз, Б.Л. Остеопороз: этиология, диагностика, лечение / Б.Л. Риггз, Л.Дж. Мелтон III. – СПб.: ЗАО «Издательство БИНОМ», «Невский диалект», 2000. – 560 с.
14. Роль мезенхимных стромальных/стволовых клеток в регуляции кроветворения в 3D-культуре in vitro / П.А. Иванов, К.А. Юрова,

- О.Г. Хазиахматова // Российский иммунологический журнал. – 2021. – Т. 24, № 2. – С. 153-160.
- 15.Сергеев, Ю.Д., Базина, О.О. Актуальное российское законодательство о гемопоэтических стволовых клетках (обзор законодательства Российской Федерации) / Ю.Д. Сергеев, О.О. Базина // Медицинское право. – 2019. – № 6. – С. 9-15.
- 16.Стимулирующее влияние высоких доз гепарина на миграционную активность и сохранение стволовости МСК в присутствии остеозамещающих материалов / И.К. Норкин, К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова и др.// Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 831-838.
- 17.Тодосенко, Н.М. Реакции Т-лимфоцитов больных ревматоидным артритом на глюкокортикоиды *in vitro* / Н.М. Тодосенко. – Санкт-Петербург, 2018. – 172 с.
- 18.Хаитов, Р.М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р.М. Хаитов, М.В. Пащенко, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 66–74.
19. Хайдуков, С.В. Ионицин-резистентная субпопуляция CD4⁺ Т-лимфоцитов периферической крови человека. Функциональная характеристика / С.В. Хайдуков, И.В. Холоденко, И.С. Литвинов // Биологические мембраны. – 2003. – Т. 20, № 4. – С. 333–340.
- 20.Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации, пролиферации и апоптотической гибели Т-клеток иммунной памяти *in vitro* / Литвинова Л.С., Сохоневич Н.А., Гуцол А.А. и соавт. // Цитология. – 2013. – Т. 55. – С. 566–571.
- 21.Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию генов Gfi1 и U2af1l4 в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки / Н.А. Сохоневич, К.А. Юрова, А.А. Гуцол и др. //

- Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 2. – С. 196–200.
22. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. - М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 752 с.
23. 3D cell culture and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells plated onto jet-sprayed or electrospun micro-fiber scaffolds / M.A. Brennan, A. Renaud, A.L. Gamblin et al. // *Biomed. Mater.* – 2015. – V. 10, № 4. – P. 045019.
24. 3D TECA hydrogel reduces cellular senescence and enhances fibroblasts migration in wound healing / L.T. Younis, M.I. Abu Hassan, T.B. Taiyeb Ali et al. // *Asian. J. Pharm. Sci.* – 2018. – V. 13, № 4. – P. 317–325.
25. A cell-based screen for splicing regulators identifies hnRNP LL as a distinct signal-induced repressor of CD45 variable exon 4 / D.J. Topp, J. Jackson, A.A. Melton et al. // *RNA.* – 2008. – V. 14. – P. 2038–2049.
26. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation / I. Takada, M. Mihara, M. Suzawa et al. // *Nature Cell Biology.* – 2007. – V. 9. – P. 1273–1285.
27. A New Approach to Cultivation of Immunocompetent Cells / L.S. Litvinova, V.V. Shupletsova, K.A. Yurova et al. // *Biologicheskie membrany.* – 2018. – V. 35, № 2. – P. 159–165.
28. A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone / T.L. Andersen, T.E. Sondergaard, K.E. Skorzynska et al. // *Am. J. Pathol.* – 2009. – V. 174, № 1. – P. 239–247.
29. 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. – V. 7, № 1. – P. 97.

30. A role of TRAIL in killing osteoblasts by myeloma cells / I. Tinhofer, R. Biedermann, M. Krismer et al. // *FASEB J.* – 2006. – V. 20, № 6. – P. 759–761.
31. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure / V.K. Yadav, F. Oury, N. Suda et al. // *Cell.* – 2009. – V. 138. – P. 976–989.
32. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation / P. Bialek, B. Kern, X. Yang et al. // *Dev. Cell.* – 2004. – V. 6. – P. 423–435.
33. Activation of the hypoxia-inducible factor-1 α pathway accelerates bone regeneration / C. Wan, S.R. Gilbert, Y. Wang et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – V. 105. – P. 686–691.
34. 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. – V. 7, № 2. – P. 006949.
35. Adipose-derived stem cell: A better stem cell than BMSC / Y. Zhu, T. Liu, K. Song et al. // *Cell Biochemistry and Function.* – 2008. – V. 26, № 6. – P. 664–675.
36. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation / B.A. Bunnell, M. Flaat, C. Gagliardi et al. // *Methods.* – 2008. – V. 45, № 2. – P. 115–120.
37. Adipose-derived stromal cell immunosuppression of T cells is enhanced under "physiological" hypoxia / A.N. Gornostaeva, P.I. Bobyleva, E.R. Andreeva et al. // *Tissue Cell.* – 2020. – V. 63. – P. 101320.
38. Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche / M. Maryanovich, A.H. Zahalka, H. Pierce et al. // *Nat. Med.* – 2018. – V. 24. – P. 782–791.

39. Adult blood stem cell localization reflects the abundance of reported bone marrow niche cell types and their combinations / K.D. Kokkaliaris, L. Kunz, N. Cabezas-Wallscheid et al. // *Blood*. – 2020. – V. 136. – P. 2296–2307.
40. Advanced cell culture platforms: a growing quest for emulating natural tissues / M. Mirbagheri, V. Adibnia, B.R. Hughes et al. // *Materials Horizons*. – 2019. – V. 6, № 1. – P. 45–71.
41. Age-dependent impairment of number and angiogenic potential of adipose tissue-derived progenitor cells / R. Madonna, F.V. Renna, C. Cellini et al. // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – V. 41, № 2. – P. 126–133.
42. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M.F. Pittenger // *Blood*. – 2005. – V. 105, № 4. – P. 1815–1822.
43. Aggregation of human mesenchymal stromal cells eliminates their ability to suppress human T cells / A.J. Burand Jr., Di L, L.K. Boland et al. // *Front Immunol*. – 2020. – V. 11. – P. 143.
44. Alternative technique for calcium phosphate coating on titanium alloy implants / V.Q. Le, G. Pourroy, A. Cochis et al. // *Biomatter*. – 2014. – V. 4. – № e28534.
45. Anderson, H.C. Matrix vesicles and calcification / H.C. Anderson // *Current Rheumatology Reports*. – 2003. – V. 5. – P. 222–226.
46. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence / Y. Kunisaki, I. Bruns, C. Scheiermann et al. // *Nature*. – 2013. – V. 502, № 7473. – P. 637–643.
47. Asada, N. Regulation of hematopoiesis in endosteal microenvironments / N. Asada, Y. Katayama // *Int. J. Hematol*. – 2014. – V. 99. – P. 679–684.

48. Assessment of compromised fracture healing / J.A. Bishop, A.A. Palanca, M.J. Bellino et al. // *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* – 2012. – V. 20. – P. 273–282.
49. Atretkhany, K.-S.N. Distinct modes of TNF signaling through its two receptors in health and disease / K.-S.N. Atretkhany, V.S. Gogoleva, M.S. Drutskaya // *J. Leukoc. Biol.* – 2020. – V. 107, № 6. – P. 893–905.
50. Aurora, A.B. Immune modulation of stem cells and regeneration / A.B. Aurora, E.N. Olson // *Cell Stem Cell.* – 2014. – V. 15, № 1. – P. 14–25.
51. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis / M. Nollet, S. Santucci-Darmanin, V. Breuil et al. // *Autophagy.* – 2014. – V. 10. – P. 1965–1977.
52. Bae, S.E. Controlled release of bone morphogenetic protein (BMP)-2 from nanocomplex incorporated on hydroxyapatite-formed titanium surface / S.E. Bae, K. de Groot, E.B. Hunziker // *J. Control. Release.* – 2012. – V. 160. – P. 676–684.
53. Baldrige, M.T. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells / M.T. Baldrige, K.Y. King, M.A. Goodell // *Trends Immunol.* – 2011. – V. 32, № 2. – P. 57–65.
54. Barba, M. Adipose-derived stem cell therapies for bone regeneration / M. Barba, G. Di Taranto, W. Lattanzi // *Expert Opinion on Biological Therapy.* – 2017. – V. 17, № 6. – P. 677–689.
55. Barry, F.P. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / F.P. Barry, J.M. Murphy // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2004. – V. 36, №4. – P. 568–584.
56. Bel, S. Immunology: A bacterial nudge to T-cell function / S. Bel, L.V. Hooper // *Nature.* – 2015. – V. 526, № 7573. – P. 328–330.
57. Bellido, T. Osteocyte-driven bone remodeling / T. Bellido // *Calcif. Tissue Int.* – 2014. – V. 94, № 1. – P. 25–34.

58. Bergwitz, C. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23 / C. Bergwitz, H. Juppner // *Ann. Rev. Med.* – 2010. – V. 61. – P. 91–104.
59. Bernardo, M. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation / M.E. Bernardo, W.E. Fibbe // *Cell Stem Cell.* – 2013. – V. 13. – P. 392–402.
60. Bershadsky, A.D. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity / A.D. Bershadsky, N.Q. Balaban, B. Geiger // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2003. – V. 19. – P. 677.
61. Bicer, M. Impact of 3D cell culture on bone regeneration potential of mesenchymal stromal cells / M. Bicer, G.S. Cottrell, D. Widera // *Stem Cell Res Ther.* – 2021. – V. 12, № 1. – № 31.
62. Bioactive Coatings for Orthopaedic Implants—Recent Trends in Development of Implant Coatings / B.G.X. Zhang, D.E. Myers, G.G. Wallace et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – V. 15, № 7. – P. 11878–11921.
63. Bioinformatics analysis of the biological changes involved in the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells / T. Fan, R. Qu, Q. Yu et al. // *J. Cell Mol. Med.* – 2020. – V. 24, № 14. – P. 7968–7978.
64. Biological Characteristics and Osteogenic Differentiation of Ovine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulated with FGF-2 and BMP-2 / S. Gromolak, A. Krawczenko, A. Antończyk et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21, № 24. – P. 9726.
65. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells / R. Florencio-Silva, G.R. Sasso, E. Sasso-Cerri et al. // *BioMed. Res. Int.* – 2015. – V. 2015. – № 421746.
66. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine 2nd ed. / B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen et al. // San Diego, California, London: Elsevier Inc., 2004. – 851 p.

67. Biomechanical force in blood development: extrinsic physical cues drive pro-hematopoietic signaling / H.J. Lee, N. Li, S.M. Evans et al. // *Differentiation*. – 2013. – V. 86. – P. 92–103.
68. Biomechanical properties of native basement membranes / J. Candiello, M. Balasubramani, E.M. Schreiber et al. // *FEBS J.* – 2007. – V. 274. – P. 2897–2908.
69. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation / M. Beederman, J.D. Lamplot, G. Nan et al. // *J. Biomed. Sci. Eng.* – 2013. – V. 6, № 8A. – P. 32–52.
70. 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. – V. 98, № 5. – P. 617–625.
71. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions / E. Gomez-Barrena, P. Rosset, D. Lozano et al. // *Bone*. – 2015. – V. 70. – P. 93–101.
72. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF / B.O. Zhou, H. Yu, R. Yue et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2017. – V. 19. – P. 891–903.
73. Bone marrow laminins influence hematopoietic stem and progenitor cell cycling and homing to the bone marrow / K.H. Susek, E. Korpos, J. Huppert et al. // *Matrix Biol.* – 2018. – V. 67. – P. 47–62.
74. Bone Marrow Niches and Tumour Cells: Lights and Shadows of a Mutual Relationship / V. Granata, L. Crisafulli, C. Nastasi et al. // *Front. Immunol.* – 2022. – V. 13. – P. 884024.
75. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells / N. He, L. Zhang, J. Cui et al. // *Bone Marrow Research*. – 2014. – V. 2014. – P. 128436.

76. Bone regeneration in critical-sized bone defect enhanced by introducing osteoinductivity to biphasic calcium phosphate granules / D. Wang, A. Tabassum, G. Wu et al. // *Clin. Oral Implant. Res.* – 2017. – V. 28. – P. 251–260.
77. Bone regeneration in inflammation with aging and cell-based immunomodulatory therapy / J. Kushioka, S.K.-H. Chow, M. Toya et al. // *Inflamm. Regen.* – 2023. – V. 43. – P. 29.
78. Bone regeneration: a novel osteoinductive function of spongostan by the interplay between its nano- and microtopography / T. Vordemvenne, D. Wahnert, J. Koettnitz et al. // *Cells.* – 2020. – V. 9, № 3. – P. 654.
79. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes / J.E. Horton, L.G. Raisz, H.A. Simmons et al. // *Science.* – 1972. – V. 177. – P. 793–795.
80. Bonewald, L.F. Osteocytes as dynamic multifunctional cells / L.F. Bonewald // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2007. – V. 1116. – P. 281–290.
81. Bonewald, L.F. Osteocytes, mechanosensing and WNT signaling / L.F. Bonewald, M.L. Johnson // *Bone.* – 2008. – V. 42. – P. 606–615.
82. Boning up on autophagy: the role of autophagy in skeletal biology / I.M. Shapiro, R. Layfield, M. Lotz et al. // *Autophagy.* – 2014. – V. 10, № 1. – P. 7–19.
83. 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. – V. 21, № 4. – P. 354–364.
84. Bozec, A. T Regulatory Cells in Bone Remodelling / A. Bozec, M.M. Zaiss // *Curr. Osteoporos. Rep.* – 2017. – V. 15, № 3. – P. 121–125.
85. Branemark, P.-I. Osseointegration and its experimental background / P.-I. Branemark // *J. Prosthet. Dent.* – 1983. – V. 50. – P. 399–410.

86. Brouhard, G.J. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics / G.J. Brouhard, L.M. Rice // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2018. – V. 19, № 7. – P. 451–463.
87. Brown, G. Towards a New Understanding of Decision-Making by Hematopoietic Stem Cells / G. Brown // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21, № 7. – P. 2362.
88. Brunetti, G. In Vivo and In Vitro Models for the Study of Bone Remodeling and the Role of Immune Cells / G. Brunetti, M. Grano // *Methods Mol. Biol.* – 2021. – V. 2325. – P. 97–106.
89. Brunner, M. β 1 integrins mediate the BMP2 dependent transcriptional control of osteoblast differentiation and osteogenesis / M. Brunner, N. Mandier, T. Gautier // *PLoS One.* – 2018. – V. 13, № 4. – № e0196021.
90. Brylka, L.J. Chemokines in Physiological and Pathological Bone Remodeling / L.J. Brylka, T. Schinke // *Front. Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 2182.
91. Butte, J.M. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing [Electronic resource] / J.M. Butte, J.S. Lee, J. Jesneck // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7, № 6. - Mode of access: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0040032>].
92. 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. – V. 85, № 1. – P. 279–299.
93. Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis / P. Sukumaran, V.N. Da Conceicao, Y. Sun et al. // *Cells.* – 2021. – V. 10, № 8. – P. 2125.
94. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells / A.I. Caplan // *J. Orthop. Res.* – 1991. – V. 9. – P. 641–650.

95. Cappariello, A. The “soft” side of the bone: unveiling its endocrine functions / A. Cappariello, M. Ponzetti, N. Rucci // *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* – 2016. – V. 28. – P. 5–20.
96. 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. – V. 13, № 1. – P. 76–90.
97. CD169 macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress / A. Chow, M. Huggins, J. Ahmed et al. // *Nat. Med.* – 2013. – V. 19. – P. 429–436.
98. 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. – V. 25. – P. 37–47.
99. CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation / M. Takedachi, H. Oohara, B. J. Smith et al. // *J. Cell Physiol.* – 2012. – V. 227. – P. 2622–2631.
100. Cell contact interaction between adipose-derived stromal cells and allo-activated T lymphocytes / M.E. Quaedackers, C.C. Baan, W. Weimar et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – V. 39, № 12. – P. 3436–3446.
101. Cell shape, cytoskeletal tension, and rhoa regulate stem cell lineage commitment / R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson et al. // *Dev. Cell.* – 2004. – V. 6. – P. 483–495.
102. Cell-IQ visualization of motility, cell mass, and osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells cultured with relief calcium phosphate coating / L.S. Litvinova, V.V. Shupletsova, K.A. Yurova et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2017. – V. 476, № 1. – P. 310–315.
103. Cellular and molecular basis of osteoblastic and vascular niches in the processes of hematopoiesis and bone remodeling (A short review of

- modern views) / K.A. Yurova, O.G. Khaziakhmatova, E.S. Melashchenko et al. // *Current Pharmaceutical Design*. – 2019. – V. 25, № 6. – P. 663–669.
104. Cellular Response to Individual Components of the Platelet Concentrate / V. Sovkova, K. Vocetkova, V. Hedvičáková et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22, № 9. – P. 4539.
105. Changes in the secretome of tri-dimensional spheroid-cultured human mesenchymal stem cells in vitro by interleukin-1 priming / E. Redondo-Castro, C.J. Cunningham, J. Miller et al. // *Stem Cell Res Ther.* – 2018. – V. 9, № 1. – P. 11.
106. 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. – V. 23, № 4. – P. 459–460.
107. Choi, J.S. Marrow-inspired matrix cues rapidly affect early fate decisions of hematopoietic stem and progenitor cells / J.S. Choi, B.A. Harley // *Sci. Adv.* – 2017. – V. 3. – № e1600455.
108. Choi, J.S. The combined influence of substrate elasticity and ligand density on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells / J.S. Choi, B.A.C. Harley // *Biomaterials*. – 2012. – V. 33. – P. 4460–4468.
109. Christopher, M.J. Granulocyte colony-stimulating factor induces osteoblast apoptosis and inhibits osteoblast differentiation / M.J. Christopher, D.C. Link // *J. Bone Miner. Res.* – 2008. – V. 23. – P. 1765–1774.
110. Chronic infection depletes hematopoietic stem cells through stress-induced terminal differentiation / K.A. Matatall, M. Jeong, S. Chen et al. // *Cell Rep.* – 2016. – V. 17. – P. 2584–2595.
111. Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal

- / E.M. Pietras, C. Mirantes-Barbeito, S. Fong et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2016. – V. 18, № 6. – P. 607–618.
112. Chung, A.S. Developmental and pathological angiogenesis / A.S. Chung, N. Ferrara // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2011. – V. 27. – P. 563–584.
113. Clarkin, C.E. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication? / C.E. Clarkin, L.C. Gerstenfeld // *Cell Biochemistry and Function.* – 2013. – V. 31. – P. 1–11.
114. CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow / A. Nakamura-Ishizu, K. Takubo, H. Kobayashi et al. // *J. Exp. Med.* – 2015. – V. 212. – P. 2133–2146.
115. Co-cultivation of progenitor cells enhanced osteogenic gene expression and angiogenesis potential in vitro / Y. Jia, C. Zhang, Zheng X. et al. // *J. Int. Med. Res.* – 2021. – V. 49, № 4. – № 03000605211004024.
116. Cohnheim, J. Ueber entzündung und eiterung / J. Cohnheim // *Path Anat Physiol Klin Med.* – 1867. – V. 40. – P. 1–79.
117. Collagen nanofibres are a biomimetic substrate for the serum-free osteogenic differentiation of human adipose stem cells / L.S. Sefcik, R.A. Neal, S.N. Kaszuba et al. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2008. – V. 2, № 4. – P. 210–220.
118. Comazzetto, S. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow / S. Comazzetto, B. Shen, S.J. Morrison // *Dev. Cell.* – 2021. – V. 56, № 13. – P. 1848–1860.
119. 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. – V. 24, № 26. – P. 3034–3054.

120. Concise review: bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic / J.J. Bara, R.G. Richards, M. Alini // *Stem Cells*. – 2014. – V. 32, № 7. – P.1713–1723.
121. Costimulatory effect of blood cells and rough calcium phosphate coating on the angiogenic and osteogenic features of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in mixed culture as a model of postimplantation tissue repair / I.A. Khlusov, L.S. Litvinova, V.V. Shupletsova et al. // *Materials (Basel)*. – 2020. – V. 13, № 19. – P. 4398.
122. CRYAB promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stem cells via stabilizing β -catenin and promoting the Wnt signalling / B. Zhu, F. Xue, G. Li et al. // *Cell Prolif.* – 2020. – V. 53, № 1. – № e12709.
123. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance / A. Greenbaum, Y.-M.S. Hsu, R.B. Day et al. // *Nature*. – 2013. – V. 495. – P. 227–230.
124. da Silva, M.L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / M.L. da Silva, P.C. Chagastelles, N.B. Nardi // *Journal of Cell Science*. – 2006. – V. 119, № 11. – P. 2204–2213.
125. Dalby, M.J. Harnessing nanotopography and integrin–matrix interactions to influence stem cell fate / M.J. Dalby, N. Gadegaard, R.O.C. Oreffo // *Nature materials*. – 2014. – V. 14, № 6. – P. 558–569.
126. Danks, L. Immunology and bone / L. Danks, H. Takayanagi // *J. Biochem.* – 2013. – V. 154, № 1. – P. 29–39.
127. Davalos, D. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease / D. Davalos, K. Akassoglou // *Semin. Immunopathol.* – 2012. – V. 34. – P. 43–62.
128. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal / M. Acar, K.S. Kocherlakota, M.M. Murphy et al. // *Nature*. – 2015. – V. 526, № 7571. – P. 126–130.

129. 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. – V. 19, № 5. – P. 534–540.
130. Deposition of collagen type I onto skeletal endothelium reveals a new role for blood vessels in regulating bone morphology / A. Ben Shoham, C. Rot, T. Stern et al. // *Development.* – 2016. – V. 143. – P. 3933–3943.
131. Deretic, V. Autophagy in infection, inflammation and immunity / V. Deretic, T. Saitoh, S. Akira // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – V. 13. – P. 722–737.
132. 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. – V. 7, № 10. – P. 3573–3585.
133. 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. – V. 35. – P. 9023–9032.
134. Ding, L. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches / L. Ding, S.J. Morrison // *Nature.* – 2013. – V. 495. – P. 231–235.
135. Dirckx, N. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration / N. Dirckx, M. Van Hul, C. Maes // *Birth Defects Res. C Embryo. Today.* – 2013. – V. 99. – P. 170–191.
136. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis / T. Itkin, S. Gur-Cohen, J.A. Spencer et al. // *Nature.* – 2016. – V. 532, № 7599. – P. 323–328.
137. Diverse effect of BMP-2 homodimer on mesenchymal progenitors of different origin / E. Hrubí, L. Imre, A. Robaszkiewicz et al. // *Hum. Cell.* – 2018. – V. 31, № 2. – P. 139–148.

138. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation / M.S. Choudhery, M. Badowski, A. Muise et al. // *Journal of Translational Medicine*. – 2014. – V. 12. – P. 8.
139. 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. – V. 205. – P. 1723–1729.
140. Elevated IL-7 availability does not account for T cell proliferation in moderate lymphopenia / L.C. Osborne, D.T. Patton, J.H. Seo et al. // *J. Immunol.* – 2011. – V. 186, № 4. – P. 1981–1988.
141. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // *Toxicol Pathol.* – 2007. – V. 35, № 4. – P. 495–516.
142. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape / C.H. Thomas, J.H. Collier, C.S. Sfeir et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – V. 99. – P. 1972–1977.
143. Enhanced in vitro osteogenic differentiation of human fetal MSCs attached to 3D microcarriers versus harvested from 2D monolayers / A. Shekaran, E. Sim, K.Y. Tan et al. // *BMC Biotechnol.* – 2015. – V. 15. – P. 102.
144. Enhanced osteogenic differentiation with 3D electrospun nanofibrous scaffolds / L.T. Nguyen, S. Liao, C.K. Chan et al. // *Nanomedicine (Lond)*. – 2012. – V. 7, № 10. – P. 1561–1575.
145. Enhancement of individual differences in proliferation and differentiation potentials of aged human adipose-derived stem cells / M. Kawagishi-Hotta, S. Hasegawa, T. Igarashi et al. // *Regenerative Therapy*. – 2017. – V. 6. – P. 29–40.

146. Enhancing inflammatory and chemotactic signals to regulate bone regeneration / E. M. Czekanska, J. R. Ralphs, M. Alini et al. // *Eur. Cell Mater.* – 2014. – V. 28. – P. 320–334.
147. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival / S.A. Crum, G.A. Miranda-Carboni, P.W. Hauschka et al. // *The EMBO Journal.* – 2008. – V. 27. – P. 535–545.
148. 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. – V. 19, № 8. – P. 2171.
149. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression / T. Nakashima, M. Hayashi, T. Fukunaga et al. // *Nat. Med.* – 2011. – V. 17. – P. 1231–1234.
150. Evidence for the secretion of an osteoclast stimulating factor in myeloma / G.R. Mundy, L.G. Raisz, R.A. Cooper et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1974. – V. 291. – P. 1041–1046.
151. Exosome loaded alginate hydrogel promotes tissue regeneration in full-thickness skin wounds: an in vivo study / S. Shafei, M. Khanmohammadi, R. Heidari et al. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2020. – V. 108, № 3. – P. 545–556.
152. Expanding diversity in molecular structures and functions of the IL-6/IL-12 heterodimeric cytokine family / H. Hasegawa, I. Mizoguchi, Y. Chiba et al. // *Front. Immunol.* – 2016. – V. 7. – P. 479.
153. Experience in the Adaptive Immunity Impacts Bone Homeostasis, Remodeling, and Healing / C.H. Bucher, C. Schlundt, D. Wulsten et al. // *Front. Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 797.
154. 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. – V. 16. – P. 1004–1014.
155. Fluid Flow-induced Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms Regulate Actin Adaptation in Osteoblasts / M.M. Thi, S.O. Suadicani, D.C. Spray // *Journal of Biological Chemistry.* – 2010. – V. 285. – P. 30931–30941.
156. Friedenstein, A.J. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs / A.J. Friedenstein, J.F. Gorskaja, N.N. Kulagina // *Exp. Hematol.* – 1976. – V. 4. – P. 267–274.
157. Friedenstein, A.J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells / A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhjan, K.S. Lalykina // *Cell Tissue Kinet.* – 1970. – V. 3. – P. 393–403.
158. 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. – V. 146, № 5. – P. 2324–2335.
159. 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. – V. 10, № 4. – P. 287–291.
160. G-CSF regulates hematopoietic stem cell activity, in part, through activation of Toll-like receptor signaling / L.G. Schuettpelz, J.N. Borgerding, M.J. Christopher et al. // *Leukemia.* – 2014. – V. 28, № 9. – P. 1851–1860.
161. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation / B. Kulterer, G. Friedl, A. Jandrositz et al. // *BMC Genomics.* – 2007. – V. 8. – № 70.

162. Gerosa, L. Bone-to-Brain: A Round Trip in the Adaptation to Mechanical Stimuli / L. Gerosa, G. Lombardi // *Front. Physiol.* – 2021. – V. 12. – P. 623893.
163. Graca, L. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts / L. Graca, S.P. Cobbold // *J. Exp. Med.* – 2002. – V. 195, № 12. – P. 1641–1646.
164. Greenblatt, M.B. Bone Turnover Markers in the Diagnosis and Monitoring of Metabolic Bone Disease / M.B. Greenblatt, J.N. Tsai, M.N. Wein // *Clin. Chem.* – 2017. – V. 63, № 2. – P. 464–474.
165. Greenblatt, M.B. Osteoimmunology: A brief introduction / M.B. Greenblatt, J.-H. Shim // *Immune Netw.* – 2013. – V. 13. – P. 111–115.
166. Gupta, S. CD95-mediated apoptosis in naïve, central and effector memory subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in aged humans / S. Gupta, S. Gollapudi // *Exp. Gerontol.* – 2008. – V. 43, № 4. – P. 266–274.
167. Gyurkovska, V. Distinct roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in viral and bacterial infections: From pathogenesis to pathogen clearance / V. Gyurkovska, N. Ivanovska // *Inflamm. Res.* – 2016. – V. 65, № 6. – P. 427–437.
168. Harris, N. Immunology: Chronic effects of acute infections / N. Harris // *Nature.* – 2015. – V. 526, № 7574. – P. 509–510.
169. Hart, D.A. Why mesenchymal stem/progenitor cell heterogeneity in specific environments? / D.A. Hart // *Stem Cells Int.* – 2014. – V. 7. – P. 526–532.
170. Hausman, M.R. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis / M.R. Hausman, M.B. Schaffler, R.J. Majeska // *Bone.* – 2001. – V. 29. – P. 560–564.
171. Heyd, F. Phosphorylation-Dependent Regulation of PSF by GSK3 Controls CD45 Alternative Splicing / F. Heyd, W.K. Lynch // *Molecular Cell.* – 2010. – V. 40. – P. 126–137.

172. Ho, I.-C. Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases / I.-C. Ho, S.-C. Miaw // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2016. – V. 941. – P. 31–77.
173. Hu, K. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair / K. Hu, B.R. Olsen // *J. Clin. Invest.* – 2016. – V. 126. – P. 509–526.
174. Hu, K. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration / K. Hu, B.R. Olsen // *Bone.* – 2016. – V. 91. – P. 30–38.
175. Hua, X. Quiescent T cells: actively maintaining inactivity / X. Hua, C.B. Thompson // *Nature immunology.* – 2001. – V. 2, №12. – P. 1097–1098.
176. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation / M.J. Crop, C.C. Baan, S.S. Korevaar et al. // *Stem Cells and Development.* 2010. – V. 19, № 12. – P. 1843–1853.
177. Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional de-novo regulatory T cells with methylated *FOXP3* gene DNA / A.U. Engela, M.J. Hoogduijn, K. Boer et al. // *Clinical & Experimental Immunology.* – 2013. – V. 173, № 2. – P. 343–354.
178. 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. – V. 9, № 1. – P. 184.
179. Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes encapsulated in functional peptide hydrogels promote cardiac repair / C. Han, J. Zhou, C. Liang et al. // *Biomater. Sci.* – 2019. – V. 7, № 7. – P. 2920–2933.
180. Hunter, C.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease / C.A. Hunter, S.A. Jones // *Nat. Immunol.* – 2015. – V. 16. – P. 448–457.

181. Identification of Key Signaling Pathways Orchestrating Substrate Topography Directed Osteogenic Differentiation Through High-Throughput siRNA Screening / T. Ozdemir, D.T. Bowers, X. Zhan et al. // *Scientific Reports*. – 2019. – V. 9. – № 1001.
182. Identification of potential modifiers of Runx2/Cbfa1 activity in C2C12 cells in response to bone morphogenetic protein-7 / K. Gu, L. Zhang, T. Jin et al. // *Cells Tissues Organs*. – 2004. – V. 176. – P. 28–40.
183. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size / J. Zhang, C. Niu, L. Ye et al. // *Nature*. – 2003. – V. 425. – P. 836–841.
184. IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo / M.A.G. Essers, S. Offner, W.E. Blanco-Bose et al. // *Nature*. – 2009. – V. 458(7240). – P. 904–908.
185. IFN α -mediated remodeling of endothelial cells in the bone marrow niche / Á.M. Prendergast, A. Kuck, M. van Essen et al. // *Haematologica*. – 2017. – V. 102. – P. 445–453.
186. IFN- γ -mediated hematopoietic cell destruction in murine models of immune-mediated bone marrow failure / J. Chen, X. Feng, M.J. Desierto et al. // *Blood*. – 2015. – V. 126. – P. 2621–2631.
187. Immune modulation by transplanted calcium phosphate biomaterials and human mesenchymal stromal cells in bone regeneration / P. Humbert, M.Á. Brennan, N. Davison et al. // *Front. Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 663.
188. Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering / H. Li, S. Shen, H. Fu et al. // *Stem Cells Int.* – 2019. – V. 2019. – P. 9671206.
189. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte

- reaction systems / P.C. Demircan, A.E. Sariboyaci, Z.S. Unal et al. // *Cytotherapy*. – 2011. – V. 13, № 10. – P. 1205–1220.
190. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells / O.S. Beane, V.C. Fonseca, L.L. Cooper et al. // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, № 12. – № e115963.
191. In vitro cellular response to titanium electrochemically coated with hydroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness / H. Marcelo, P.H. Silva, G.D.A. Soares et al. // *J. Mater Sci: Mater. Med.* – 2003. – V. 14. – P. 511–519.
192. 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. – V. 96, № 6. – P. 3120–3125.
193. Inflammation, Fracture and Bone Repair / F. Loi, L.A. Córdova, J. Pajarinen et al. // *Bone*. – 2016. – V. 86. – P. 119–130.
194. Inhibition of actin polymerization decreases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway / H. Sonowal, A. Kumar, J. Bhattacharyya et al. // *Journal of Biomedical Science*. – 2013. – V. 20. – №71.
195. Inhibition of Rac and ROCK signalling influence osteoblast adhesion, differentiation and mineralization on titanium topographies / P.D. Prowse, C.G. Elliott, J. Hutter et al. // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № e58898.
196. Interaction of multipotent mesenchymal stromal and immune cells: Bidirectional effects Author links open overlay panel / E. Andreeva, P. Bobyleva, A. Gornostaeva et al. // *Cytotherapy*. – 2017. – V. 19, № 10. – P. 1152–1166.
197. Interactions between MSCs and Immune Cells: Implications for Bone Healing / T.K. Kovach, A.S. Dighe, P.I. Lobo et al. // *J. Immunol. Res.* 2015. – V. 2015. – P. 752510.

198. Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma / H.-E. Tzeng, C.-H. Tsai, Z.-L. Changet al. // *Biochem. Pharmacol.* – 2013. – V. 85. – P. 531–540.
199. Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma / H.E. Tzeng, C.H. Tsai, Z.L. Chang et al. // *Biochemical Pharmacology.* – 2013. – V. 85. – P. 531–540.
200. Interleukin-6 signaling regulates hematopoietic stem cell emergence / R. Tie, H. Li, S. Cai et al. // *Exp. Mol. Med.* 2019. – V. 51, № 10. – P. 1–12.
201. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation / Y. Liu, A.D. Berendsen, S. Jia et al. // *J. Clin. Invest.* – 2012. – V. 122. – P. 3101–3113.
202. Investigation on the in vitro cytocompatibility of Mg-Zn-Y-Nd-Zr alloys as degradable orthopaedic implant materials / X. Song, L. Chang, J. Wang et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* – 2018. – V. 29, № 4. – P. 44.
203. In-vitro- и In-vivo-Knochenregenerierung durch mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut / M. Jäger, M. Sager, A. Knipper et al. // *Der Orthopäde.* – 2004. – V. 33, № 12. – P. 1361–1372.
204. Ito, H. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources / H. Ito // *Mod. Rheumatol.* – 2011. – V. 21, № 2. – P. 113–121.
205. 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. – V. 110, № 8. – P. 3056–3063.

206. Jimenez-Puerta, G.J. Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use / G.J. Jimenez-Puerta, J.A. Marchal, E. López-Ruiz et al. // *J. Clin. Med.* – 2020. – V. 9, № 2. – P. 445.
207. Jones, R.G. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation / R.G. Jones, C.B. Thompson // *Immunity.* – 2007. – V. 27, № 12. – P. 173–178.
208. Kandarakov O., Belyavsky A., Semenova E. Bone Marrow Niches of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells / O. Kandarakov, A. Belyavsky, E. Semenova // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23, № 8. – P. 4462.
209. Katsimbri, P. The biology of normal bone remodelling / P. Katsimbri // *Eur. J. Cancer Care (Engl).* –2017. – V. 26, № 6.
210. Kawabe, T. Homeostasis of Naive and Memory T Lymphocytes / T. Kawabe, J. Yi, J. Sprent // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2021. – V. 13, № 9. – № a037879.
211. Kiel, M.J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells / M.J. Kiel, S.J. Morrison // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – V. 8, № 4. – P. 290–301.
212. Kim, H.J. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages / H.J. Kim, J.-S. Park // *Dev. Reprod.* – 2017. – V. 21, № 1. – P. 1–10.
213. Kini, U. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In: *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging* / U. Kini, B. Nandeesh – Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. – p. 29–57.
214. Kokkaliaris, K.D. Dissecting the spatial bone marrow microenvironment of hematopoietic stem cells / K.D. Kokkaliaris // *Curr. Opin. Oncol.* – 2020. – V. 32. – P. 154–161.

215. Korn, T. Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets / T. Korn, M. Hiltensperger // *Cytokine*. – 2021. – V. 146. – P. 155654.
216. Kumar, G. From Crosstalk between Immune and Bone Cells to Bone Erosion in Infection / G. Kumar, P.-M. Roger // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20, № 20. – P. 5154.
217. 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. – V. 13. – P. 217.
218. Lambert, C. Bone Marrow Immunity and Myelodysplasia / C. Lambert, Y. Wu, C. Aanei // *Front. Oncol.* – 2016. – V. 6. – P. 172.
219. Lee, J.H. Long-duration three-dimensional spheroid culture promotes angiogenic activities of adipose-derived mesenchymal stem cells / J.H. Lee, Y.S. Han, S.H. Lee // *Biomol. Ther. (Seoul)*. – 2016. – V. 24, № 3. – P. 260–267.
220. Lee-Thedieck, C. Artificial niches: biomimetic materials for hematopoietic stem cell culture. *Macromol* / C. Lee-Thedieck, J.P. Spatz // *Rapid Commun.* – 2012. – V. 33. – P. 1432–1438.
221. Lee-Thedieck, C. Biophysical regulation of hematopoietic stem cells / C. Lee-Thedieck, J.P. Spatz // *Biomater. Sci.* – 2014. – V. 2. – P. 1548–1561.
222. Lee-Thedieck, C. The extracellular matrix of hematopoietic stem cell niches / C. Lee-Thedieck, P. Schertl, G. Klein // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2022. – V. 181. – № 114069.
223. Liao, H.T., Chen, C. T. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells / H.T. Liao, C.T. Chen // *World Journal of Stem Cells*. – 2014. – V. 6, № 3. – P. 288–295.

224. Lin, J. T cell receptor signaling / J. Lin, A. Weiss // *J. Cell Sci.* – 2001. – V. 114, № 2. – P. 243–244.
225. Liu, T.M. Stemness of Mesenchymal Stem Cells. Preliminary Study / T.M. Liu // *J. Stem Cell Ther. Transplant.* – 2017. – V. 1. – P. 71–73.
226. 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. – V. 235, № 10. – P. 7496–7515.
227. Mahony, C.B. How HSCs Colonize and Expand in the Fetal Niche of the Vertebrate Embryo: An Evolutionary Perspective / C.B. Mahony, J.Y. Bertrand // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2019. – V. 7. – P. 34.
228. Marie, P.J. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets / P.J. Marie, M. Kassem // *Eur. J. Endocrinol.* – 2011. – V. 165. – P. 1–10.
229. 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. – V. 7. – P. 362.
230. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions / F. Oury, L. Khrimian, C.A. Denny et al. // *Cell.* – 2013. – V. 155. – P. 228–241.
231. Mathieu, P.S. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways / P.S. Mathieu, E.G. Loba // *Send to Tissue Eng Part B Rev.* – 2012. – V. 18, № 6. – P. 436–444.
232. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification / A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney // *Cell.* – 2006. – V. 126, № 4. – P. 677–689.

233. Matrix elasticity regulates the secretory profile of human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) / F.P. Seib, M. Prewitz, C. Werner et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – V. 389, № 4. – P. 663–667.
234. Matrix elasticity, replicative senescence and DNA methylation patterns of mesenchymal stem cells / A. Schellenberg, S. Jousen, K. Moser et al. // *Biomaterials.* – 2014. – V. 35, № 24. – P. 6351–6358.
235. Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells / N. Asada, Y. Katayama, M. Sato et al. // *Cell Stem Cell.* – 2013. – V. 12. – P. 737–747.
236. McCafferty, M.M. Mesenchymal stem cell response to conformal sputter deposited calcium phosphate thin films on nanostructured titanium surfaces / M.M. McCafferty, G.A. Burke, B.J. Meenan // *J. Biomed. Mater. Res A.* – 2014. – V. 102, № 10. – P. 3585–3597.
237. Mechanical and Vascular Cues Synergistically Enhance Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells / A.J. Steward, J.H. Cole, F.S. Ligler et al. // *Tissue Eng. Part A.* – 2016. – V. 22, № 15–16. – P. 997–1005.
238. Mechanical stress up-regulates RANKL expression via the VEGF autocrine pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells / T. Nakai, Y. Yoshimura, Y. Deyama et al. // *Molecular Medicine Reports.* – 2009. – V. 2. – P. 229–234.
239. Mechanical unloading of bone in microgravity reduces mesenchymal and hematopoietic stem cell-mediated tissue regeneration / E.A. Blaber, N. Dvorochkin, M.L. Torres et al. // *Stem Cell Res.* – 2014. – V. 13. – P. 181–201.
240. Mechanically resilient injectable scaffolds for intramuscular stem cell delivery and cytokine release / S.A. Young, S.E. Sherman, T.T. Cooper et al. // *Biomaterials.* – 2018. – V. 159. – P. 146–160.

241. Mechanics of intact bone marrow / L.E. Jansen, N.P. Birch, J.D. Schiffman et al. // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* – 2015. – V. 50. – P. 299–307.
242. Mempel, T.R. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases / T.R. Mempel, S.E. Henrickson, U.H. Von Andrian // *Nature*. – 2004. – V. 427, № 6970. – P. 154–159.
243. Mendelson, A. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration / A. Mendelson, P.S. Frenette // *Nat. Med.* – 2014. – V. 20. – P. 833–846.
244. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche / S. Mendez-Ferrer, T.V. Michurina, F. Ferraro et al. // *Nature*. – 2010. – V. 466. – P. 829–834.
245. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential / Y. Yamaguchi, J. Ohno, A. Sato et al. // *BMC Biotechnol.* – 2014. – V. 14. – P. 105.
246. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses / W. Cao, K. Cao, J. Cao et al. // *Immunol. Lett.* – 2015. – V. 168, № 2. – P. 147–53.
247. Mesenchymal stem cells and their microenvironment / J. Liu, J. Gao, Z. Liang et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2022. – V. 13, № 1. – P. 429.
248. Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease / F. Mao, Q. Tu, L. Wang et al. // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8, № 23. – P. 38008–38021.
249. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine / Y. Han, X. Li, Y. Zhang et al. // *Cells*. – 2019. – V. 8, № 8. – P. 886.
250. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing / H. Yagi, A. Soto-Gutierrez, B. Parekkadan et al. // *Cell Transplantation*. – 2010. – V. 19. – P. 667–679.

251. Metalloproteases: On the Watch in the Hematopoietic Niche / S. Saw, A. Weiss, R. Khokha et al. // *Trends Immunol.* – 2019. – V. 40, № 11. – P. 1053–1070.
252. 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. – V. 7. – P. 186.
253. 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. – V. 8, № 4. – P. 315–317.
254. Mirshekar-Syahkal, B. Concise review: From greenhouse to garden: the changing soil of the hematopoietic stem cell microenvironment during development / B. Mirshekar-Syahkal, S.R. Fitch, K. Ottersbach // *Stem Cells.* – 2014. – V. 32. – P. 1691–1700.
255. Mitchell, R.N. Innate and adaptive immunity: The immune response to foreign materials. In: *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine.* 2nd ed. / R.N. Mitchell. – San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. – p. 304–318.
256. 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. – V. 87. – P. 107–118.
257. 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. – V. 4, № 3. – P. 264–271.
258. Morrison, S.J. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells / S.J. Morrison, D.T. Scadden // *Nature.* – 2014. – V. 505. – P. 327–334.

259. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation / I. Satokata, L. Ma, H. Ohshima et al. // *Nature Genetics*. – 2000. – V. 24. – P. 391–395.
260. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno et al. // *Tissue Eng.* – 2001. – V. 7. – P. 211–226.
261. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages / P. Mombaerts, A.R. Clarke, M.A. Rudnicki et al. // *Nature*. – 1992. – V. 360. – P. 225–231.
262. Nakamura-Ishizu, A. Dynamic Changes in the Niche with N-Cadherin Revisited: The HSC “Niche Herein” / A. Nakamura-Ishizu, T. Suda // *Cell Stem Cell*. – 2019. – V. 24, № 3. – P. 355–356.
263. Natural and synthetic nanopores directing osteogenic differentiation of human stem cells / J.F. Greiner, M. Gottschalk, N. Fokin et al. // *Nanomedicine*. – 2019. – V. 17. – P. 319–328.
264. Nelson, M.R. Bone-marrow mimicking biomaterial niches for studying hematopoietic stem and progenitor cells / M.R. Nelson, K. Roy // *J. Mater. Chem. B*. – 2016. – V. 4. – P. 3490–3503.
265. Nicola, N.A. Leukemia inhibitory factor (LIF) / N. A. Nicola, J. J. Babon // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2015. – V. 26, № 5. – P. 533–544.
266. Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation / M. Sciaudone, E. Gaggero, L. Priest, A.M. Delany et al. // *Endocrinology*. – 2003. – V. 144. – P. 5631–5639.
267. Novel Artificial Scaffold for Bone Marrow Regeneration: Honeycomb Tricalcium Phosphate / Y. Inada, K. Takabatake, H. Tsujigiwa et al. // *Materials (Basel)*. – 2023. – V. 16, № 4. – P. 1393.
268. O'Connor, A.M. Interleukin-7 enhances memory CD8(+) T-cell recall responses in health but its activity is impaired in human

- immunodeficiency virus infection / A.M. O'Connor, A.M. Crawley, J.B. Angel // *Immunology*. – 2010. – V. 131, № 4. – P. 525–536.
269. Okamoto, K. Osteoimmunology / K. Okamoto, H. Takayanagi // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2019. – V. 9, № 1. – P. a031245.
270. Ono, N. Stem and progenitor cells in skeletal development / N. Ono, D.H. Balani, H.M. Kronenberg // *Curr. Top. Dev. Biol.* – 2019. – V. 133. – P. 1–24.
271. Optically transparent anionic nanofibrillar cellulose is cytocompatible with human adipose tissue-derived stem cells and allows simple imaging in 3D / J.J. Sheard, M. Bicer, Y. Meng et al. // *Stem Cells Int.* – 2019. – V. 2019. – P. 3106929.
272. Orbay, H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: Basic biological properties and clinical applications / H. Orbay, M. Tobita, H. Mizuno // *Stem Cells International*. – 2012. – V. 2012. – P. 461718–461719.
273. Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development / M. Bowers, B. Zhang, Y. Ho et al. // *Blood*. – 2015. – V. 125. – P. 2678–2688.
274. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. / C. Maes, T. Kobayashi, M.K. Selig et al. // *Dev. Cell*. – 2010. – V. 19. – P. 329–344.
275. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche / L.M. Calvi, G.B. Adams, K.W. Weibrecht et al. // *Nature*. – 2003. – V. 425. – P. 841–846.
276. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells / O. Kollet, A. Dar, S. Shivtiel et al. // *Nat. Med.* – 2006. – V. 12. – P. 57–64.

277. Osteogenic Differentiation Modulates the Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Profile of ASCs and SHED / F. Mussano, T. Genova, S. Petrillo et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19, № 5. – P. 1454.
278. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a 3D woven scaffold / M. Persson, P.P. Lehenkari, L. Berglin et al. // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8, № 1. – P. 10457.
279. Osteogenic differentiation of three-dimensional bioprinted constructs consisting of human adipose-derived stem cells in vitro and in vivo / X.F. Wang, Y. Song, Y.S. Liu et al. // *PLoS One.* – 2016. – V. 11, № 6. – № e0157214.
280. Osteoimmunology: A Current Update of the Interplay Between Bone and the Immune System / C. Guder, S. Gravius, C. Burger et al. // *Front. Immunol.* – 2020. – V. 11. – P. 58.
281. Osteopetrosis rescue upon RANKL administration to Rankl(-/-) mice: A new therapy for human RANKL-dependent ARO / N. Lo Iacono, H.C. Blair, P.L. Poliani et al. // *J. Bone Miner. Res.* – 2012. – V. 27. – P. 2501–2510.
282. Osteoporosis in Rheumatoid Arthritis: Dangerous Liaisons / I. Llorente, N. García-Castañeda, C. Valero, I. González-Álvaro, S. Castañeda // *Front. Med. (Lausanne).* – 2020. – V. 7. – № 601618.
283. Ovine synovial membrane-derived mesenchymal progenitor cells retain the phenotype of the original tissue that was exposed to in-vivo inflammation: Evidence for a suppressed chondrogenic differentiation potential of the cells / W. Ando, B.J. Heard, M. Chung et al. // *Inflamm. Res.* – 2012. – V. 61. – P. 599–608.
284. Owen, R. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders / R. Owen, G.C. Reilly // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2018. – V. 6. – P. 134.

285. Percival, C.J. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis / C.J. Percival, J.T. Richtsmeier // *Dev. Dyn.* – 2013. – V. 242. – P. 909–922.
286. Perlin, J.R. Blood on the tracks: hematopoietic stem cell-endothelial cell interactions in homing and engraftment / J.R. Perlin, A. Sporrij, L.I. Zon // *J. Mol. Med. (Berl)*. – 2017. – V. 95. – P. 809–819.
287. Pfaffl, M.W. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR / M.W. Pfaffl, M. Hageleit // *Biotechnol. Lett.* – 2001. – V. 23. – P. 275–282.
288. Pham, P. Adipose stem cells in the clinic / P. Pham // *Biomedical Research And Therapy*. – 2014. – V. 2, № 1. – P.1–14.
289. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C⁺ macrophage infiltration in mice / C. Baeck, X. Wei, M. Bartneck et al. // *Hepatology*. – 2014. – V. 59, № 3. – P. 1060–1072.
290. Pietras, E. M. Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease / E. M. Pietras // *Blood*. – 2017. – V. 130. – P. 1693–1698.
291. Pinho, S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche / S. Pinho, P.S. Frenette // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2019. – V. 20, № 5. – P. 303–320.
292. Posttranscriptional regulation of c-Myc expression in adult murine HSCs during homeostasis and interferon- α -induced stress response / A. Ehninger, T. Boch, H. Uckelmann et al. // *Blood*. – 2014. – P. 123, № 25. – P. 3909–3913.
293. Processing and properties of magnesium alloy micro-tubes for biodegradable vascular stents / J. Wang, Y. Zhou, Z. Yang et al. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – V. 90. – P. 504-513.

294. Production of RANKL by memory B cells: a link between B cells and bone erosion in rheumatoid arthritis / N. Meednu, H. Zhang, T. Owen et al. // *Arthritis Rheumatol.* – 2016. – V. 68. – P. 805–816.
295. 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. – V. 6, № 6. – P. 806–814.
296. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- γ in response to chronic infection / M.T. Baldrige, K.Y. King, N.C. Boles et al. // *Nature.* – 2010. – V. 465. – P. 793–797.
297. Raggatt, L.J. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling / L.J. Raggatt, N.C. Partridge // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285, № 33. – P. 25103–25108.
298. Ramalingam, P. Vascular Regulation of Hematopoietic Stem Cell Homeostasis, Regeneration, and Aging / P. Ramalingam, J.M. Butler, M.G. Poulos // *Curr. Stem Cell Rep.* – 2021. – V. 7, № 4. – P. 194–203.
299. Rapid Induction of Osteogenic Markers in Mesenchymal Stem Cells by Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells / J.-W. Choi, S. Shin, C.Y. Lee et al. // *Cell Physiol Biochem.* – 2017. – V. 44, № 1. – P. 53–65.
300. Ratushnyy, A. Secretome of Senescent Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Negatively Regulates Angiogenesis / A. Ratushnyy, M. Ezdakova, L. Buravkova // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21, № 5. – P. 1802.
301. Reagan, M.R. Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction / M.R. Reagan, C.J. Rosen // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2016. – V. 12, № 3. – P. 154–68.
302. Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons / E.M. Pietras, R.

- Lakshminarasimhan, J.-M. Techner et al. // *J. Exp. Med.* – 2014. – V. 211, № 2. – P. 245–262.
303. Regulation of differentiation in trabecular bone-derived mesenchymal stem cells by T cell activation and inflammation / X. Wu, W. Wang, C. Meng et al. // *Oncol. Rep.* – 2013. – V. 30, № 5. – P. 2211–2219.
304. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML factors / J.B. Lian, A. Javed, S.K. Zaidi et al. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 2003. – V. 14. – P. 1–42.
305. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration / J. Li, J. Tan, M.M. Martino et al. // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 9. – P. 585.
306. Restricted Hematopoietic Progenitors and Erythropoiesis Require SCF from Leptin Receptor+ Niche Cells in the Bone Marrow / S. Comazzetto, M.M. Murphy, S. Berto et al. // *Cell Stem Cell.* – 2019. – V. 24, № 3. – P. 477–486.e6.
307. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects / A.K. Abbas, E. Trotta, D.R. Simeonov et al. // *Sci. Immunol.* – 2018. – V. 3, № 25. – № eaat1482.
308. Ricard-Blum, S. The collagen family / S. Ricard-Blum // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – V. 3, № 1. – № a004978.
309. Roelen, B.A. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGFβ family members / B.A. Roelen, P. Dijke // *J. Orthop. Sci.* – 2003. – V. 8. – P. 740–748.
310. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction / S. Dupont, L. Morsut, M. Aragona et al. // *Nature.* – 2011. – V. 474. – P. 179–183.
311. Roostalu, J. Microtubule nucleation: beyond the template / J. Roostalu, T. Surrey // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2017. – V. 18, № 11. – P. 702–710.

312. Rose-John, S. Interleukin-6 signalling in health and disease / S. Rose-John // *F1000Res.* – 2020. – V. 9. – P. 1000.
313. Saalbach, A. Thy-1: more than a marker for mesenchymal stromal cells / A. Saalbach, U. Anderegg // *FASEB J.* – 2019. – V. 33, № 6. – P. 6689–6696.
314. Saidova, A. Lineage Commitment, Signaling Pathways, and the Cytoskeleton Systems in Mesenchymal Stem Cells / A. Saidova, I.A. Vorobjev // *Tissue Eng. Part B Rev.* – 2020. – V. 26, № 1. – P. 13–25.
315. Sánchez-Lanzas, R. Diversity in the bone marrow niche: Classic and novel strategies to uncover niche composition / R. Sánchez-Lanzas, F. Kalampalika, M. Ganuza // *Br. J. Haematol.* – 2022. – V. 199, № 5. – P. 647–664.
316. Scadden, D.T. The stem cell niche in health and leukemic disease / D.T. Scadden // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* – 2007. – V. 20, № 1. – P. 19–27.
317. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell / R. Schofield // *Blood Cells.* – 1978. – V. 4. – P. 7–25.
318. Schürch, C.M. Cytotoxic CD8⁺ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells / C.M. Schürch, C. Riether, A.F. Ochsenbein // *Cell Stem Cell.* – 2014. – V. 14. – P. 460–472.
319. Schwarz, U.S. Focal adhesions as mechanosensors: the two-spring model / U.S. Schwarz, T. Erdmann, I.B. Bischofs // *Biosystems.* – 2006. – V. 83. – P. 225.
320. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair / J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99, № 15. – P. 9996–10001.

321. Semipermeable cellulose beads allow selective and continuous release of small extracellular vesicles (sEV) from encapsulated cells / G. Zavala, M.P. Ramos, A.I. Figueroa-Valdes et al. // *Front. Pharmacol.* – 2020. – V. 11. – P. 679.
322. 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. – V. 89. – P. 119–127.
323. Shafaei, H. Adipose-derived stem cells: An appropriate selection for osteogenic differentiation / H. Shafaei, H. Kalarestaghi // *J. Cell Physiol.* – 2020. – V. 235, № 11. – P. 8371–8386.
324. Shafrir, Y. Mechanotransduction through the cytoskeleton / Y. Shafrir, G. Forgacs // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2002. – V. 282. – P. 479–486.
325. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues / U. Kozłowska, A. Krawczenko, K. Futoma et al. // *World J. Stem Cells.* – 2019. – V. 11, № 6. – P. 347–374.
326. 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. – V. 121. – P. 1109–1121.
327. Spsychala, J. Wnt and beta-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation / J. Spsychala, J. Kitajewski // *Exp. Cell. Res.* – 2004. – V. 296. – P. 99–108.
328. Stem cell factor is selectively secreted by arterial endothelial cells in bone marrow / C. Xu, X. Gao, Q. Wei et al. // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – P. 2449.

329. Stem cell niche-specific Ebf3 maintains the bone marrow cavity / M. Seike, Y. Omatsu, H. Watanabe et al. // *Genes Dev.* – 2018. – V. 32. – P. 359–372.
330. Steward, A.J. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation / A.J. Steward, D.J. Kelly // *J. Anat.* – 2015. – V. 227, № 6. – P. 717–731.
331. Strasser, A. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system / A. Strasser, P.J. Jost, S. Nagata // *Immunity.* – 2009. – V. 30, № 2. – P. 180–192.
332. 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. // *Cytherapy.* – 2013. – V. 15. – P. 641–648.
333. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo / A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhyan, N.V. Latsinik et al. // *Transplantation.* – 1974. – V. 17. – P. 331–340.
334. Stromal-derived IL-6 alters the balance of myeloerythroid progenitors during *Toxoplasma gondii* infection / D.B. Chou, B. Sworder, N. Bouladoux et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2012. – V. 92. – P. 123–131.
335. Study of T cell subsets and IL-7 protein expression in HIV-1-infected patients after 7 years HAART / C. Shou, N. Weng, Y. Jin et al. // *Eur. J. Med. Res.* – 2011. – V. 16, № 11. – P. 473–479.
336. Substrate elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells / J. Holst, S. Watson, M.S. Lord et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2010. – V. 28. – P.1123–1128.

337. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture / P.M. Gilbert, K.L. Havenstrite, K.E. Magnusson et al. // *Science*. – 2010. – V. 329, № 5995. – P. 1078–1081.
338. Sundelacruz, S. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells / S. Sundelacruz, M. Levin, D.L. Kaplan // *PLoS One*. – 2008. – V. 3, № 11. – № e3737.
339. Sung, J.H. A micro cell culture analog (μ CCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs / J.H. Sung, M.L. Shuler // *Lab on a Chip*. – 2009. – V. 9, № 10. – P. 1385–1394.
340. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation / J. Guo, M. Liu, D. Yang et al. // *Cell Metabolism*. – 2010. – V. 11. – P. 161–171.
341. Surface topography of hydroxyapatite promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells / W. Yang, W. Han, W. He et al. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* – 2016. – V. 60. – P. 45–53.
342. Surface-aminated electrospun nanofibers enhance adhesion and expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells / K.-N. Chua, C. Chai, P.-C. Lee et al. // *Biomaterials*. – 2006. – V. 27. – P. 6043–6051.
343. Sutherland, J. Contact guidance in human dermal fibroblasts is modulated by population pressure / J. Sutherland, M. Denyer, S. Britland // *J. Anat.* – 2005. – V. 206. – P. 581–587.
344. Synergistic control of mesenchymal stem cell differentiation by nanoscale surface geometry and immobilized growth factors on TiO₂ nanotubes / J. Park, S. Bauer, A. Pittrof et al. // *Small*. – 2012. – V. 8, № 1. – P. 98–107.

345. Synergistic effect of extracellularly supplemented osteopontin and osteocalcin on stem cell proliferation, osteogenic differentiation, and angiogenic properties / M.S. Carvalho, J.Ms. Cabral, C.L. da Silva et al. // *J. Cell Biochem.* – 2019. – V. 120, № 4. – P. 6555–6569.
346. Synergistic Integration of Mesenchymal Stem Cells and Hydrostatic Pressure in the Expansion and Maintenance of Human Hematopoietic/Progenitor Cells / Y.G. Kang, J.-Y. Jeong, T.-H. Lee et al. // *Stem Cells Int.* – 2018. – V. 2018. – № 4527929.
347. Systematic Review and Meta-Analysis of the Effectiveness of Calcium-Phosphate Coating on the Osseointegration of Titanium Implants / N. López-Valverde, A. López-Valverde, J.M. Aragonese et al. // *Materials (Basel).* – 2021. – V. 14, № 11. – P. 3015.
348. T lymphocytes influence the mineralization process of bone / T. El Khassawna, A. Serra, C.H. Bucher et al. // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 562.
349. Taichman, R. S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche / R. S. Taichman // *Blood.* – 2005. – V. 105, № 7. – P. 2631–2639.
350. Tavassoli, M. Transplantation of marrow to extramedullary sites / M. Tavassoli, W.H. Crosby // *Science.* – 1968. – V. 161. – P. 54–56.
351. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ / H. Takayanagi, K. Ogasawara, S. Hida et al. // *Nature.* – 2000. – V. 408. – P. 600–605.
352. Terminally differentiated CD8⁺ T cells negatively affect bone regeneration in humans / S. Reinke, S. Geissler, W.R. Taylor et al. // *Science Translational Medicine.* – 2013. – V. 5, № 177. – №177ra36.
353. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism / S.A. Hunsucker, B.S. Mitchell, J. Spychala // *Pharmacol. Ther.* – 2005. – V. 107. – P. 1–30.

354. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution / A.N. Tikhonova, I. Dolgalev, H. Hu et al. // *Nature*. – 2019. – V. 569. – P. 222–228.
355. 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. – V. 16. – P. 427–434.
356. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells / M. Zhu, E. Kohan, J. Bradley et al. // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2009. – V. 3, № 4. – P. 290–301.
357. The effect of physical cues on the stem cell differentiation / M.M. Moghaddam, S. Bonakdar, M.R. Shariatpanahi et al. // *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* – 2019. – V. 14, № 3. – P. 268–277.
358. The haematoma and its role in bone healing / H. Schell, G.N. Duda, A. Peters et al. // *J. Exp. Orthop.* – 2017. – V. 4. – P. 5.
359. The Hematopoietic Bone Marrow Niche Ecosystem / J. Fröbel, T. Landspersky, G. Percin et al. // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2021. – V. 9. – P. 705410.
360. The hypoxia-inducible factor a pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development / Y. Wang, C. Wan, L.F. Deng et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2007. – V. 117. – P. 1616–1626.
361. The IL-2A receptor pathway and its role in lymphocyte differentiation and function / Y. Li, X. Li, X. Geng et al. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2022. – V. 67. – P. 66–79.
362. The IL-4/IL-13 axis in skin fibrosis and scarring: mechanistic concepts and therapeutic targets / J.K. Nguyen, E. Austin, A. Huang et al. // *Arch. Dermatol. Res.* – 2020. – V. 312, № 2. – P. 81–92.

363. The influence of aging on the regenerative potential of human adipose derived mesenchymal stem cells / M. Maredziak, K. Marycz, K.A. Tomaszewski et al. // *Stem Cells International*. – 2016. – V. 2016. – № 2152435.
364. The influence of surface roughness of titanium on beta1- and beta3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells / F. Luthen, R. Lange, P. Becker et al. // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – P. 2423–2440.
365. The Role of Osteoprotegerin and Its Ligands in Vascular Function / L. Rochette, A. Meloux, E. Rigal et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20, № 3. – P. 705.
366. The role of osteoprotegerin in the crosstalk between vessels and bone: Its potential utility as a marker of cardiometabolic diseases / L. Rochette, A. Meloux, E. Rigal et al. // *Pharm. Ther.* – 2018. – V. 182. – P. 115–132.
367. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning / J. Filipowska, K.A. Tomaszewski, Ł. Niedźwiedzki et al. // *Angiogenesis*. – 2017. – V. 20, № 3. – P. 291–302.
368. The roles of bone remodeling in normal hematopoiesis and age-related hematological malignancies / H. Zhang, J.L. Liesveld, L.M. Calvi et al. // *Bone Res.* – 2023. – V. 11, № 1. – P. 15.
369. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases / Y. Han, J. Yang, J. Fang et al. // *Signal Transduct. Target Ther.* – 2022. – V. 7, № 1. – P. 92.
370. The secretome derived from 3D-cultured umbilical cord tissue MSCs counteracts manifestations typifying rheumatoid arthritis / J.P. Miranda, S.P. Camoes, M.M. Gaspar et al. // *Front Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 18.

371. The three-dimensional collagen scaffold improves the stemness of rat bone marrow mesenchymal stem cells / S. Han, Y. Zhao, Z. Xiao et al. // *J. Genet Genomics*. – 2012. – V. 39, № 12. – P. 633–641.
372. Theman, T.A. The Role of the calcium-sensing receptor in bone biology and pathophysiology / T.A. Theman, M.T. Collins // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2009. – V. 10, № 3. – P. 289–301.
373. Three-dimensional cell culture of human mesenchymal stem cells in nanofibrillar cellulose hydrogels / I. Azoidis, J. Metcalfe, J. Reynolds et al. // *MRS Communications*. – 2017. – V. 7, № 3. – P. 458–465.
374. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors / R. Edmondson, J.J. Broglie, A.F. Adcock // *Assay Drug Dev. Technol.* – 2014. – V. 12, № 4. – P. 207–218.
375. Three-dimensional spherical spatial boundary conditions differentially regulate osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells / Y.P. Lo, Y.S. Liu, M.G. Rimando et al. // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 21253.
376. Tissue-specific differentiation potency of mesenchymal stromal cells from perinatal tissues / A. Kwon, Y. Kim, M. Kim et al. // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – № 23544.
377. Tong, A. Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons / A. Tong, J. Nguyen, K.W. Lynch // *The journal of biological chemistry*. – 2005. – V. 280, № 46. – P. 38297–38304.
378. Transplantation of human mesenchymal stem-cell-derived exosomes immobilized in an adhesive hydrogel for effective treatment of spinal cord injury / L. Li, Y. Zhang, J. Mu et al. // *Nano Lett.* – 2020. – V. 20, № 6. – P. 4298–4305.
379. Trebak, M. Calcium signalling in T cells / M. Trebak, J.-P. Kinet // *Nat. Rev. Immunol.* – 2019. – V. 19, № 3. – P. 154–169.

380. TSG-6 inhibits neutrophil migration via direct interaction with the chemokine CXCL8 / D.P. Dyer, J.M. Thomson, A. Hermant et al. // *The Journal of Immunology*. – 2014. – V. 192, № 5. – P. 2177–2185.
381. Tsukasaki, M. Osteoimmunology: evolving concepts in bone-immune interactions in health and disease / M. Tsukasaki, H. Takayanagi // *Nat. Rev. Immunol.* – 2019. – V. 19, № 10. – P. 626–642.
382. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling / W. Tan, W. Zhang, A. Strasner et al. // *Nature*. – 2011. – V. 470. – P. 548–553.
383. Tunneling nanotubes mediate the expression of senescence markers in mesenchymal stem/stromal cell spheroids / J. Whitehead, J. Zhang, J.N. Harvestine et al. // *Stem Cells*. – 2020. – V. 38, № 1. – P. 80–89.
384. Turinetto, V. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy / V. Turinetto, E. Vitale, C. Giachino // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – V. 17, № 7. – P. 1164.
385. 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. – V. 14, № 8. – P. 1007234.
386. Ucuzian, A.A. In vitro models of angiogenesis / A.A. Ucuzian, H.P. Greisler // *World J. Surg.* – 2007. – V. 31. – P. 654–663.
387. Updating osteoimmunology: regulation of bone cells by innate and adaptive immunity / M.C. Walsh, N. Takegahara, H. Kim et al. // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2018. – V. 14. – P. 146–156.
388. van Leeuwen, E.M.M. Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells / E.M.M. van Leeuwen, J. Sprent, C.D. Surh // *Curr. Opin. Immunol.* – 2009. – V. 21, № 2. – P. 167–172.

389. 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. – V. 9. – P. 679.
390. Vegfa regulates perichondrial vascularity and osteoblast differentiation in bone development / X. Duan, Y. Murata, Y. Liu et al. // *Development.* – 2015. – V. 142. – P. 1984–1991.
391. Walsh, M.C. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond / M.C. Walsh, Y. Choi // *Front. Immunol.* – 2014. – V. 5. – P. 511.
392. Wang, W. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review / W. Wang, K.W.K. Yeung // *Bioact. Mater.* – 2017. – V. 2, № 4. – P. 224–247.
393. Watson, E.C. Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System / E.C. Watson, R.H. Adams // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2018. – V. 8, № 7. – № a031559.
394. 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. – V. 22. – P. 155–164.
395. Weitzmann, M.N. Bone and the Immune System / M.N. Weitzmann // *Toxicol. Pathol.* – 2017. – V. 45, № 7. – P. 911–924.
396. Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes / R. Anzalone, M.L. Iacono, T. Loria et al. // *Stem Cell Reviews.* – 2011. – V. 7, № 2. – P. 342–363.
397. Williams, M.A. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells / M.A. Williams, A.J. Tyznik, M.J. Bevan // *Nature.* – 2006. – V. 441. – P. 890–893.

398. Wilson, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches: Review / A. Wilson, A. Trumpp // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – V. 6. – P. 93–106.
399. Xiao, L. The Autophagy in Osteoimmunology: Self-Eating, Maintenance, and Beyond / L. Xiao, Y. Xiao // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2019. – V. 10. – P. 490.
400. Xiao, Z. Physiological mechanisms and therapeutic potential of bone mechanosensing / Z. Xiao, L.D. Quarles // *Rev. Endocrine Metab. Disorders*. – 2015. – V. 16. – P. 115–129.
401. Yang, N. The Role of the Immune Microenvironment in Bone Regeneration / N. Yang, Y. Liu // *Int. J. Med. Sci.* – 2021. – V. 18, № 16. – P. 3697–3707.
402. Yin, T. The stem cell niches in bone / T. Yin, L. Li // *J. Clin. Invest.* – 2006. – V. 116, № 5. – P. 1195–1201.
403. Zhao, B. TNF and Bone Remodeling / B. Zhao // *Curr. Osteoporos. Rep.* – 2017. – V. 15, № 3. – P. 126–134.
404. Zoch, M.L. New insights into the biology of osteocalcin / M.L. Zoch, T.L. Clemens, R.C. Riddle // *Bone*. – 2016. – V. 82. – P. 42–49.
405. Zoch, M.L. New insights into the biology of osteocalcin / M.L. Zoch, T.L. Clemens, R.C. Riddle // *Bone*. – 2016. – V. 82. – P. 42–49.
406. Zwetsloot, A.J. Measuring microtubule dynamics / A.J. Zwetsloot, G. Tut, A. Straube // *Essays Biochem.* – 2018. – V. 62, № 6. – P. 725–735.