

На правах рукописи

Юрова Кристина Алексеевна

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

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
на соискание ученой степени доктора
медицинских наук

Томск – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Научный консультант:

доктор медицинских наук

**Литвинова Лариса
Сергеевна**

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

**Повещенко Ольга
Владимировна**

Доктор медицинских наук, профессор кафедры природных соединений, фармацевтической и медицинской химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Чурина Елена Георгиевна

Доктор медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

**Кайгородова Евгения
Викторовна**

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

Защита состоится _____ на заседании диссертационного совета Д 21.2.068.03 при ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Мустафина Лилия Рамильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 S., 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 [Cappariello 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, остециты, 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 гематопозитических 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; Ruger V.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. Трехмерный 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 γ , TNF α , 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 гемопоэзидуцирующего 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- ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, 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 гемопозитических 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 ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$ 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 лейкоцвесей условно здоровых доноров, и стромальных стволовых клеток (далее ССК), полученных из жировой ткани условно здоровых доноров.

Основные методы исследования:

1. Получение Т-лимфоцитов из лейкоцвесей 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 объеме 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы 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 декларацией 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).

Выделение МНК из лейкозвеси здоровых доноров проводили стандартным методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077$ г/см³). Для избавления смеси мононуклеаров 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). Отсутствие моноцитов (CD14) и В-лимфоцитов (CD19) в культурах Т-клеток до культивирования было подтверждено проточной цитофлуориметрией. В эксперименте были использованы клеточные культуры, с содержанием CD3 лимфоцитов более 97%. ССК получали из липоаспирата человека по методике [Zuk P.A. et al., 2001], с помощью механической и ферментативной дезагрегации тканей. Анализ соответствия полученных клеток популяции ССК проводился согласно морфологическим критериям по предписанию International Society for Cellular Therapy [Dominici M. et al., 2006]. Эксперимент проведен с использованием клеток, имеющих доказанную принадлежность к популяции ССК с жизнеспособностью более 95%. 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), 2мМ/л L-глутамин («Sigma-Aldrich», США), 100 Е/мкг/мл пенициллин/стрептомицин («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. Двухмерная модель культивирования служила контролем для оценки морфофункционального состояния клеток, культивируемых с использованием трехмерной модели. 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. Для моделирования границы раздела кость/кровообразующее микроокружение использовали 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) VT1.0 размером 10x10x1 мм³ и несущих рельефное (индекс шероховатости Ra=2,0–3,0 мкм) микродуговое двустороннее кальций-фосфатное покрытие (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск). 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, на дно планшета высеивали ССК, после прикрепления ССК и образования монослоя добавляли суспензию ИК. *Оценку жизнеспособности клеток* и определение реализации апоптоза клеток проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия) с использованием набора реагентов «ViaCount Reagent» («Millipore», США). Общее количество клеток (ОКК) в культурах клеток считали с использованием автоматического счётчика клеток (Countess TM Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с применением красителя трипанового синего 0.4% (Trypan blu) («Invitrogen», США).

Оценку морфофункционального состояния (активации, дифференцировки, созревания, пролиферации и гибели) клеточных культур в условиях 2D- и 3D-сокультивирования проводили, основываясь на оценке морфологии клеток, изменения антигенного профиля клеточных мембран (CD детерминант), экспрессии генов дифференцировки, и секреции цитокинов. Для определения антигенных детерминант *иммунокомпетентных клеток* проводили иммунофенотипирование клеток с применением коктейля моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD71, CD95, CD45, CD45RA, CD45RO («eBioscience», USA) на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия). 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). Определение 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.

Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте, приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Последовательность используемых олигонуклеотидных праймеров

Название гена	Последовательность
<i>RPLPO</i>	F: 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3'
	R: 5'-CCATCAGCACACAGCCTTC-3'
	Probe: Bgl635-5'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'-BHQ-2
<i>GFI1</i>	F: 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'
	R: 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'
	Probe: FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1
<i>U2af114</i>	F: 5'-CTTACAACAAGCCGACATTC-3'
	R: 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3'
	Probe: FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1
<i>hnRPLL</i>	F: 5'-CTCTCAATTCAGAATCCGCTTTATC-3'
	R: 5'-CCATTGCTTGTATCCCATTTCTC-3'
	Probe: FAM-5'-TATGCAACCCTGTTGGCAAAGTGC-3'~BHQ-1
<i>RUNX2</i>	F:5'-CCAGAAGGCACAGACAGAAG-3'
	R: 5'-GATGAGGAATGCGCCCTAAA-3'
	Probe: 5'-FAM-AGTTTGTCTCTGACCGCCTCAGT--BHQ1-3'
<i>BMP2</i>	F:5'-ACGAGGTCCTGAGCGAGTT-3'
	R: 5'-GACCTGAGTGCCTGCGATAC-3'
	Probe: 5'-FAM-CTGAAACAGAGACCCACCCCCAGCA-BHQ1-3'
<i>BMP6</i>	F:5'-TTACAGGAGCATCAGCACAG-3'
	R: 5'-GGAGTCACAACCCACAGATT-3'
	Probe: 5'-FAM-CCTCAGAAGAAGGCTGGCTGGAAT-BHQ1 -3'
<i>BGLAP</i>	F: 5'-GAGGGTATAAACAGTGCTGGAG-3'
	R: 5'-AATAGGGCGAGGAGTGTGA-3'
	Probe: 5'-FAM-CAGCCACCGAGACACCATGAGA-BHQ1-3'
<i>ALPL</i>	F:5'-GGGAAATCTGTGGGCATTGT-3'
	R: 5'-GAGTACCAGTCCCGGTCAGC-3'
	Probe: 5'-FAM-ACCACGAGAGTGAACCATGCCA-BHQ1-3'
<i>TBP</i>	F: 5' - TCTTGGCGTGTGAAGATAACC-3'
	R: 5' - GCTGGAACCTCGTCTCACTATTC-3'
	Probe: 5' - FAM-AGTTGCTGAGAAGAGTGTGCTGGA-BHQ1 -3'
<i>HPRT1</i>	F: 5' - TGGCGTCGTGATTAGTGATG-3'
	R: 5' - GACGTTCACTCCTGTCCATAAT-3'
	Probe: 5' - FAM-TGCTGAGGATTTGGAAAGGGTGT-BHQ1-3'
<i>UBC</i>	F: 5' - CATAAGACTCGGCCTTAGAACC-3'
	R: 5' - GTTCCGCTCTCTGAAAAGAA -3'
	Probe: 5'-FAM-TTAGGACGGGACTTGGGTGACTCT - BHQ1-3'
<i>FGF10</i>	F: 5' - GATTGAGAAGAACGGGAAGGT-3'
	R: 5' - GCTTTGACGGCAACAAC-3'
	Probe: 5' - FAM-CAGCGGGACCAAGAAGGAGAACTG-BHQ1-3'
<i>TBX5</i>	F: 5' - ATCATAACCAAGGCTGGAAGG-3'
	R: 5' - CAGGTACAATGTCCATGAGAAGA-3'
	Probe: 5' - FAM-AGTTACAAAGTGAAGGTGACGGGC-BHQ1-3'
<i>SMURF1</i>	F: 5' - CCACCCATATATCCCTCCTTTAC-3'
	R: 5' - CTGTGTGACCAAAGCCAAAG-3'
	Probe: 5'-FAM-ACCCACTTCCATCACCCATCCAAT-BHQ1-3'

ПЦР проводили в трех повторах с использованием реагента qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфических гидролитических флуоресцентных зондов и праймеров в концентрации 10 пМ («Beagle», Россия) в амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген RPLP0. Результат ПЦР анализа был рассчитан методом максимума второй производной (Second Derivative Maximum method), с помощью модифицированной формулы Пфаффа [Pfaffl M.W., Hageleit M., 2001]. *Количественное определение факторов роста*, хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-6, Eotaxin, TNF α , RANTES, TRAIL, LIF, SCF, G-CSF, IL-4, IL-10, IL-13, IL-7) 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). *Оценка суммарной площади очагов минерализации и содержания клеток с морфологией кроветворных* в разных экспериментальных культурах проводилась методом компьютерной морфометрии. В качестве среды для положительного контроля остеодифференцировки использовали готовую остеоиндуктивную среду StemPro Osteogenesis Differentiation Kit («Thermo Fisher Scientific», США) (**2D-остео**). 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. 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. Морфометрическое исследование площади окрашенных клеток проводили 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]. Результаты оценки общей площади минерализации трёхмерных очагов/узелков выражали в мм² / см² поверхности лунки планшета (площадь поверхности лунки планшета равна 4 см²). *Определение уровня остеокальцина в супернатантах разных экспериментальных культур проводили методом иммуноферментного анализа* в супернатантах 21-дневных клеточных культур ССК с использованием коммерческого набора N-MID Osteocalcin ELISA 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. *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 средневыборочные 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 – r²) анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости p < 0,05 (Кремер Н.Ш., 2004).

Схема дизайна исследования представлена на рисунке 1.

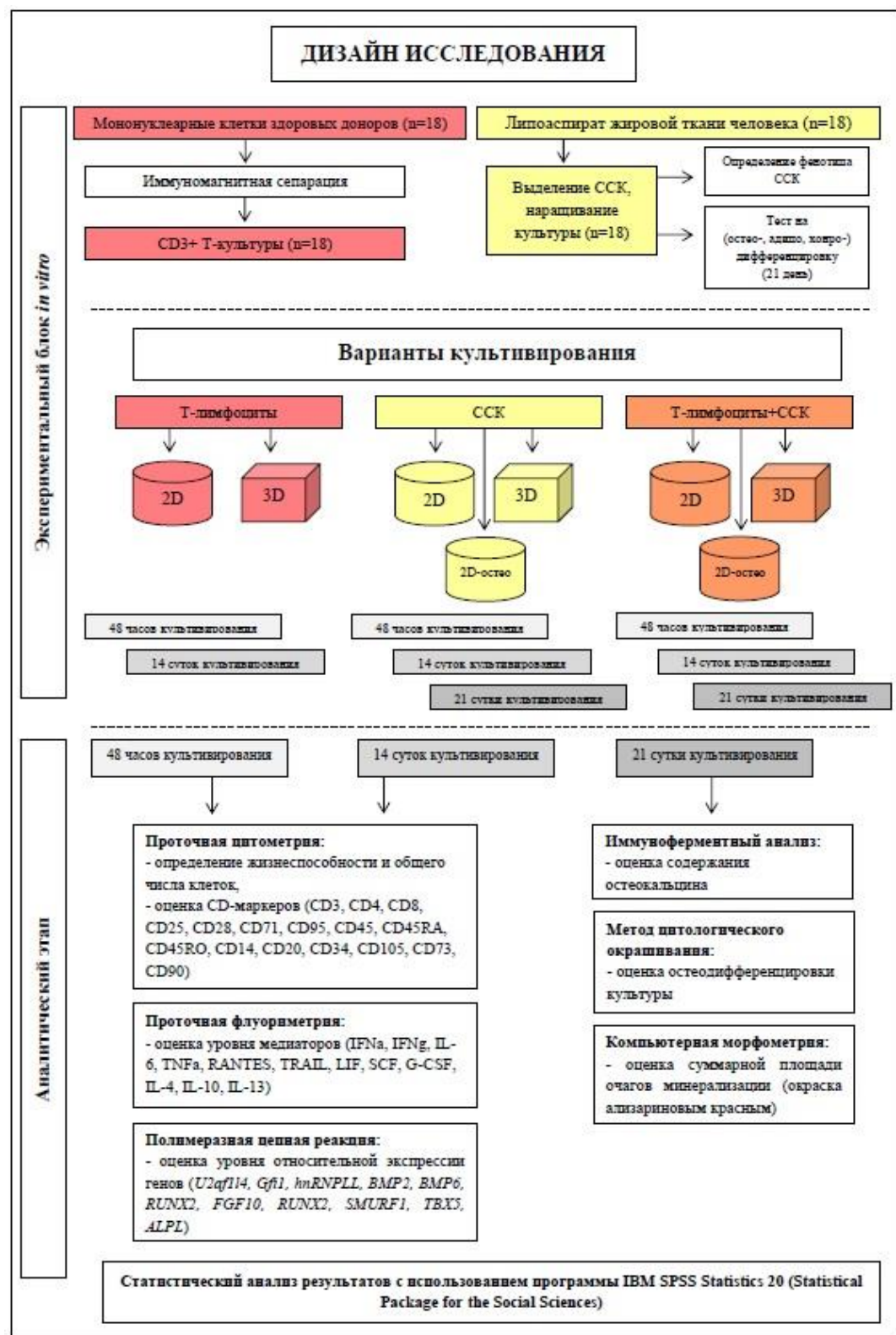


Рисунок 1 - Схема дизайна исследования

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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 матриксов, имитирующих регенерирующую костную ткань (3D-модель культивирования). Для экспериментального моделирования кооперации стромальных стволовых и иммунных клеток *in vitro*, нами были использованы трехмерные матриксы 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]. 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.

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 кардиоцитов 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 %. Процентное содержание субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток составило 66,83 (64,38 – 69,11) и 33,17 (30,89 – 35,62)%, соответственно. Важно отметить, что Т-клетки (как хелперные, так и цитотоксические популяции) экспрессировали молекулу костимуляции CD28, которая опосредовала их длительное выживание в среде культивирования. Увеличение числа клеток, несущих маркер ранней активации CD25, преимущественно, за счет популяции цитотоксических Т-лимфоцитов, свидетельствует об увеличении

активационного потенциала клеток в присутствии трехмерного матрикса, что подтверждается увеличенной цитокинпродуцирующей активностью Т-лимфоцитов в 3D-модели по истечении 48 часов культивирования. 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 [Хайтов Р.М., 2009]. Естественным окончанием процесса клеточной дифференцировки является активационный апоптоз. CD95 (APO-1, FAS) представляет собой маркер готовности лимфоцитов к запуску активационного апоптоза. Апоптоз, который обусловлен активацией CD95, необходим для снижения числа активированных клеток [Gupta S., 2008] и сохранения гомеостаза иммунной системы для обеспечения равновесия пролиферации иммунокомпетентных клеток и их апоптотической гибели. Нарушение этого баланса приводит к развитию патологических процессов [Elmore S., 2007]. Однако отмечается, что Т-клетки памяти не чувствительны к Fas/FasL апоптозу. 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 [Kawabe T. et al., 2021]. 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] и принимает участие в инициации большого комплекса местных проявлений воспаления. 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. 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 [Brylka L.J., Schinke T., 2019]. TNF α представляет собой плеiotропный 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) [Atretkhanu K.-S.N. et al., 2020] 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 [Ho I.-C., Miaw S.-C., 2016]. 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, индуцируя последующие фазы заживления. 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 (Симбирцев А.С., 2018). Обнаруженные нами отрицательные корреляционные взаимосвязи IL-4 с CD4⁺CD95⁺ ($r > 0,81$; $p < 0,05$) и IL-10 с CD8⁺CD95⁺ ($r > 0,83$; $p < 0,05$) 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 признаком дифференцировки наивных Т-клеток в Т-клетки памяти. 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 [Юрова К.А., 2015]. 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 [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.

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, клетки способны дифференцироваться в клетки иммунологической памяти, а также образовывать переходные, дубль-позитивные формы Т-лимфоцитов. Отмечается, что дифференцировка клеток и формирование Т-лимфоцитов памяти регулируется путем реализации процесса альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, 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*, *U2af114* и *Gfi1*. Особенности взаимодействия указанных факторов регулируют экспрессию вариантов рецептора CD45 на поверхности клеток [Сохоневич Н.А. и др., 2015]. Молекула CD28 известна как ключевой костимулирующий рецептор, необходимый 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 *U2af114*, *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 них) культивирования по сравнению с интактной 2D-культурой. Транскрипция мРНК гена *U2af114* повышалась (в 1,65 раза) в физиологической модели и по сравнению с интактными 2D-культурами (таблица 2). 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), продуцируемых иммунокомпетентными клетками. Важно отметить, что активация клеток инициирована 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 (рисунок 2).

Таблица 2 - 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
	1	2	3
<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) p1 < 0,05	1,67 (1,08 – 1,84) p2 < 0,05	1,87 (1,68 – 2,01) p3 < 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 иммунокомпетентных клеток по U-критерию Манна – Уитни (48 часов); p2 < 0,05 – достоверные различия по сравнению с 2D культурой иммунокомпетентных клеток по U-критерию Манна – Уитни (14 суток); p3 < 0,05 – достоверные различия по сравнению с 2D смешанной культурой иммунокомпетентных клеток+стромальных стволовых клеток по U-критерию Манна – Уитни.

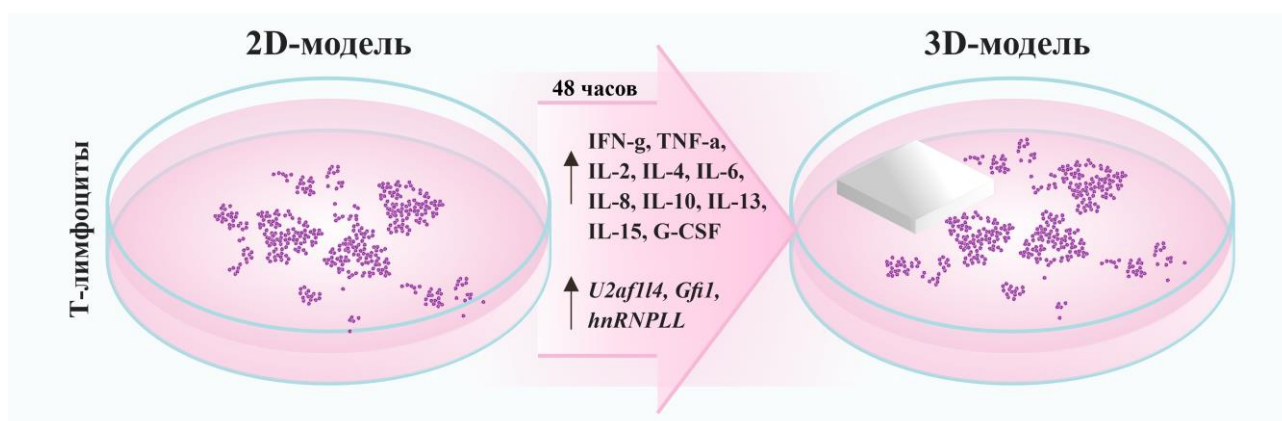


Рисунок 2 - Кооперация неприлипающих иммунокомпетентных клеток и трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 48 часов культивирования.

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]. Известно, что 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 M.M. et al., 2014; Юрова К.А. и др., 2021]. В ходе проведенного исследования, по истечении 14 суток культивирования было обнаружено, что наличие искусственных трехмерных матриксов ($Ra=2,0-3,0$ 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 3). 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 [Saalbach A., 2019]. Обнаружено, что при условии дифференцировки ССК, экспрессия CD90 на клеточной поверхности уменьшается [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 [Szychala 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].

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]. Sutherland J. et al. (2005),

было показано, что на клеточную адгезию и пролиферацию влияет топография поверхности.

Таблица 3 – Иммунофенотип стромальных стволовых клеток в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования – 14 суток), Me(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.

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]. 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]. Изменение архитектуры цитоскелета сопровождается передачей сигналов в ядро и приводит к активации ядерных транскрипционных факторов YAP/TAZ, что объясняет участие механических стимулов в остеогенной дифференцировке ССК [Dupont S. et al., 2011]. 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 4). *RUNX2* был описан как самый ранний остеогенный маркер [Gromolak S. et al., 2020] и считается одним из основных детерминант генеза остеобластов из ССК. *RUNX2* регулирует активность гена щелочной фосфатазы (*ALPL*), которая является ранним индикатором клеточной активности и дифференциация [Kulterer V. 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 4). 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 Ca^{2+} , что способствует формированию минерального матрикса кости. 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 [Hrubi 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, иницируя 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 4). 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. 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 может

косвенно указывать на процесс формирования так называемой «ниши остеобластов», с созданием гемопозиндуцирующего микроокружения.

Гемопозитические 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].

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 (таблица 3) и наряду с минерализацией внеклеточного матрикса, убедительно доказывает выраженную дифференцировку части ССК в остеобласты, в присутствии трехмерного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань.

Большая роль в регуляции дифференцировки ССК отведена пара- и аутокринному влиянию цитокинов [Mussano F. 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]. 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 [Khlusov I.A. et al., 2018]. Таким образом, особое внимание в проведенном исследовании было отведено оценке уровня продукции ССК медиаторов, которые влияют на ранние этапы кроветворения и участвуют в процессах самоподдержания, миграции и дифференцировки ГСК. ГСК, как правило, находятся в состоянии покоя [Schuettpeitz 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 гемопозитических стволовых клеток и их клеток-предшественниц ГСК [Tie R. et al., 2019]. Нами было выявлено, что культивирование ССК в присутствии трехмерных матриксов 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 γ , IL-6 и TNF α (таблица 5).

Таблица 4 - Уровень относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки в стромальных стволовых клетках жировой ткани человека в различных экспериментальных культурах (срок культивирования - 14 суток), Ме (Q1 - Q3)

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

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

Снижение IFN γ в трехмерной модели культивирования наблюдалось более чем в два раза ($p<0,05$). Показано, что IFN γ регулирует активность клеточного цикла ГСК [Morales-Mantilla D.E., King K.Y., 2018], внесение IFN γ в культуры CD34⁺ клеток *in vitro* сопровождается повышением числа жизнеспособных клеток [Baldrige M.T. et al., 2011]. Также было показано, что IFN γ потенцирует рост гемопоэтических предшественников крови [Baldrige M.T. et al., 2011]. Отмечается, что повышенный уровень IFN γ отрицательно влияет на гомеостаз ГСК, способствуя дифференцировке, а не самообновлению клеток, что в конечном итоге вызывает истощение компартмента ГСК [Morales-Mantilla D.E., King K.Y., 2018]. Выявлено, 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 по сравнению с результатами, которые были получены при оценке контрольной 2D-модели культивирования клеток ($p<0,05$) (таблица 5).

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 сравнении со значениями, которые были получены при оценке контрольных 2D-культур ($p<0,05$). 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 ниже, чем в экспериментальных 3D-культурах в сравнении с результатами, которые были получены при оценке контрольных 3D-культур ССК по истечении 14 суток культивирования ($p<0,05$). В работе Rochette L. et al. (2019) отмечается функциональную 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 (таблица 5) 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 гемопоэтических клеток-предшественниц, в частности, клеток моноцитарного ряда

[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, вероятно, активация RANTES потенцирует активацию пролиферации в этих клетках. Индукция секреции RANTES, опосредованная высоким содержанием Ca^{2+} в среде может быть физиологически важной, т.к. процесс резорбции кости остеокластами запускает изменения в функции остеобластов, 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]. 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. Известно, что RANTES является молекулой, способствующей выживанию остеобластов и может функционировать как хемоаттрактант для этих клеток [Yano S. et al., 2005; Иванов П.А., 2021]. 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. 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, G-CSF, LIF и других многофункциональных цитокинов и хемокинов, регулирующих, преимущественно, функциональную активность и миграцию ГСК (таблица 6). 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. 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]. 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 (таблица 6). Концентрация G-CSF увеличивалась в 1,6 раз по окончании 14 суток культивирования в сравнении с контрольными 2D-культурами ССК ($p<0,05$) (таблица 6).

Таблица 5 - Содержание факторов с провоспалительной (IFN γ , IL-6, TNF α), хемоаттрактантной (RANTES) и проапоптотической (TRAIL) активностью в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования - 14 суток), Ме (Q₁ - Q₃), n=18

Изучаемые 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
TNF α , 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
IFN γ , 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) p1 < 0,05	11,51 (4,14 - 16,41) p1,2 < 0,05	33,08 (19,21 - 76,22) p1,2,3 < 0,05	473,51 (428,11-515,63) p1,2,3,4 < 0,05	538,41 (410,16-655,38) p1,2,3,4,5 < 0,05
TRAIL, пг/мл	0	0	4,43 (3,15 - 5,45)	2,80 (2,52 - 2,86) p3 < 0,05	0	0

Примечание: p₁ – достоверные различия с 2D-культурой иммунокомпетентных клеток, p₂ – достоверные различия с 3D-культурой иммунокомпетентных клеток, p₃ – достоверные различия с 2D-культурой стромальных стволовых клеток, p₄ – достоверные различия с 3D-культурой стромальных стволовых клеток, p₅ – достоверные различия со смешанной 2D-культурой стромальных стволовых клеток+иммунокомпетентных клеток, согласно U критерию Манна-Уитни.

G-CSF регулирует кроветворение и связан с выживанием, пролиферацией клеток-предшественников гранулоцитов, а также высвобождением мезенхимальных предшественников [Brown G., 2020]. Некоторые гемопоэтические цитокины контролируют выживание и пролиферацию ГСК и управляют судьбой клеточных клонов [Brown G., 2020]. Продукция SCF культурой ССК в присутствии трехмерных матриц с кальций-фосфатным покрытием, увеличилась по сравнению с 2D-монокультурами ($p < 0,05$) (таблица 6). Фактор (SCF) имеет решающее значение для гемопоэтического гомеостаза. Показано, что SCF регулирует экспрессию белков, участвующих в пролиферации, хондрогенезе и регуляции экстрацеллюлярного матрикса. Показано, что SCF, продуцируемый остеобластами, важен для мобилизации ГСК [Li S.-D. et al., 2017; Иванов П.А., 2021].

Таблица 6 – Содержание гемопоэтических факторов роста (LIF, SCF, G-CSF) в супернатантах различных экспериментальных культур *in vitro* (срок культивирования - 14 суток), Ме ($Q_1 - Q_3$)

Исследуемые 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: p_1 – достоверные различия с 2D-культурой стромальных стволовых клеток, p_2 – достоверные различия с 3D-культурой стромальных стволовых клеток, p_3 – достоверные различия со смешанной 2D-культурой стромальных стволовых клеток+иммунокомпетентных клеток, согласно *U* критерию Манна-Уитни.

Фактор ингибирования лейкемии (LIF) является наиболее плеiotропным членом семейства цитокинов интерлейкина-6. Показано, что 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; Юрова К.А. и др., 2021]. 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 ($p < 0,05$) (таблица 6).

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 матриксов с кальций-фосфатным покрытием в условиях культивирования *in vitro*. Описанный факт подтверждается выявленными положительными корреляционными взаимосвязями между количеством $[CD45,34,14,20]^+$ и 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 монокультурах ССК.

Таким образом, в условиях экспериментального дистантного сокультивирования ССК с 3D матриксами, несущими КФ-покрытие, по истечении 14-ти суток культивирования отмечалось окончание провоспалительной фазы, что подтверждается снижением концентрации провоспалительных ($TNF\alpha$, IL-6, $IFN\gamma$) медиаторов и проапоптотических (TRAIL) факторов в культуре ССК, а также инициацией клеточной дифференцировки ССК в остеобласты (повышение экспрессии генов *RANX2*, *ALPL*, *BMP-6*) (таблицы 4, 5). 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 матриксов 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 $(2,44 (1,76 - 3,98) \text{ мм}^2/\text{см}^2)$ по сравнению с показателями, полученными при оценке двумерной модели культивирования. Однако в модели сравнения (2D-культура ССК с

добавлением остеодифференцировочной среды) площадь очагов минерализации была больше и составила 3,86 (2,68 – 5,41) мм²/см² (таблица 7).

В 2D-культуре ССК в присутствии остеогенной дифференцировочной среды (2D_osteo контроль) количество клеток с морфологией кроветворных оставалось на уровне контрольной 2D-монокультуры (таблица 7). Однако в экспериментальной культуре клеток в присутствии 3D-матрикса увеличение площади очагов минерализации наблюдалось на фоне повышения числа клеток с морфологией кроветворных (более чем в 3 раза) (таблица 7). 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 ($r=0,90$; $p<0,05$).

Таблица 7 – Содержание клеток с морфологией кроветворных в культурах стромальных стволовых клеток человека в различных экспериментальных культурах *in vitro* (срок культивирования – 21 день), Me (Q₁ - Q₃), n=18

Варианты культивирования ССК	Суммарная площадь очагов минерализации, мм² / см²	Число клеток с морфологией кроветворных (на мм² снимка поверхности лунки планшета)
2D-культура ССК в ППС, c=180	0 (0 - 0,15)	23,19 (18,42 – 27,12)
2D-модель_остео, c=200	3,86 (2,68 – 5,41) p1<0,001	26,08 (22,45 – 32,14)
3D-культура ССК в ППС, c=200	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, c=180	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 c=150	6,23 (4,45 – 7,43) p1,2,3,4<0,001	338,65 (283,47 – 382,3) p1,2,3,4<0,05

Примечание: n1 - 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

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 ($r=0,5967$, $p<0,05$).

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, который 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]. 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 является логически обоснованным заверением процессов дифференцировки культуры ССК в остеогенном направлении в 3D-модели культивирования (рисунок 3).

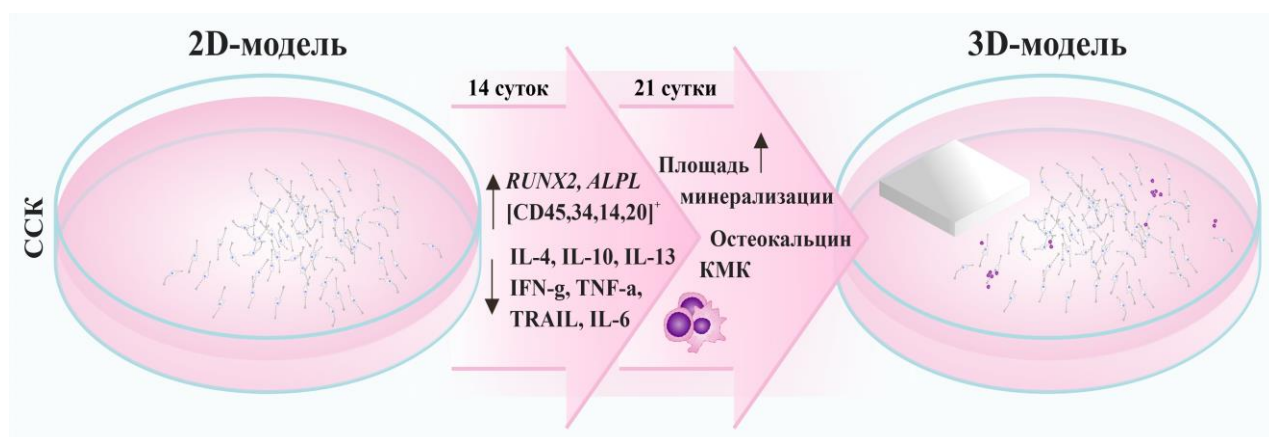


Рисунок 3 – Схема гемопоза и остеогенеза в условиях дистантного культивирования *in vitro* монокультуры стромальных стволовых клеток человека в присутствии трёхмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием

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 морфологией кроветворных коррелировало с увеличением содержания в супернатантах клеточных культур гемопоэтинов (SCF , LIF , $G-CSF$ и хемокин $RANTES$) и уменьшением уровня содержания медиаторов с провоспалительным ($IFN\gamma$, $IL-6$ и $TNF\alpha$) и проапоптотическим ($TRAIL$) действием (рисунок 3). 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 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 благодаря пористой структуре и кальций-фосфатному покрытию [Khlusov 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]. Гемопоэтические 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 [Khlusov I.A. et al., 2020]. Совместное культивирование ССК и иммунокомпетентных клеток крови характеризовались значительным увеличением секреции биологически активных медиаторов - цитокинов, факторов роста, ангиогенных молекул и остеомодулирующих молекул, по сравнению с контрольными монокультурами ($p < 0,05$) (таблицы 5, 6). По сравнению с 2D смешанной культурой ССК было выявлено достоверное увеличение концентрации следующих факторов: IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, G-CSF, TNF α ($p < 0,05$) (таблицы 5, 6).

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. 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. На наш взгляд, увеличение

содержания Т-клеток памяти в смешанной культуре обусловлено увеличением транскрипции мРНК гена *U2AF26* (таблица 2), 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 (таблица 2).

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].

Существенным моментом аутофагии в остеогенезе является ее участие в дифференцировке и минерализации остеобластов, особенно роль аутофагосомы во внеклеточном транспорте кальция. Аутофагия также участвует в поддержании ниши гемопоэтических стволовых клеток костного мозга [Xiao L., Xiao Y., 2019].

Отмечается фундаментальная 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. В отличие от *RUNX2*, остеокальцин является маркером остеобластной дифференцировки на поздней стадии [Wu S. et al., 2018]. Было выявлено повышение секреции остеокальцина в смешанной 3D-культуре при сокультивировании ССК с искусственным трехмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань по сравнению с 2D-культурами. Повышение уровня относительной экспрессии мРНК гена *ALP* в смешанных 3D-культурах (таблица 4) приводит к появлению в межклеточном пространстве неорганических фосфатов в свободной форме, которые при взаимодействии с ионами кальция формируют минеральный гидроксиапатит 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]. Увеличение уровня относительной экспрессии мРНК основных остеодифференцировочных генов (*RUNX2*, *ALP*, *SMURF*) в смешанной культуре (таблица 4), на фоне увеличенной минерализации межклеточного матрикса (таблица 7) 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 биодеградации 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 (рисунок 4).

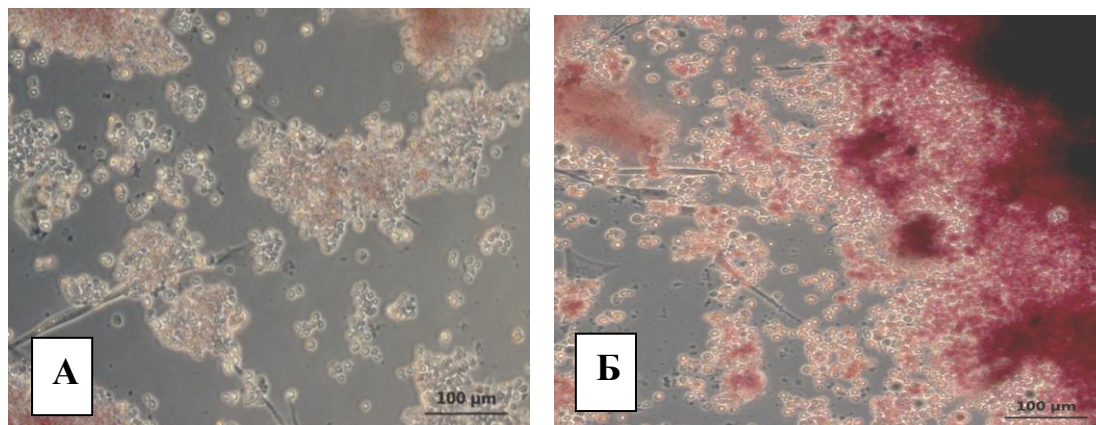


Рисунок 4 - Состояние смешанной 2D-культуры (А) и 3D-культуры (Б) стромальные клетки + неприлипающие иммунокомпетентные клетки. Окраска ализариновым красным. Линейка - 100 мкм.

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*) происходило на фоне достоверного увеличения числа клеток с морфологией кроветворных в 2D- и 3D- смешанных культурах (таблицы 4, 7). При оценке смешанных культур иммунокомпетентных клеток и ССК отмечалось значительное увеличение числа [CD45⁺,34⁺,14⁺,20⁺] клеток (более чем в 15 раз) (таблица 3). Корреляционный анализ выявил сильную связь убыли доли клеток, несущих маркеры ССК (CD105⁺) ($r = -0,91$; $p < 0,05$), 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]. Микроокружение ГСК в костном мозге, называемое нишей, обеспечивает гемопозитический 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 секретируемых 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]. 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. 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 [CD45,34,14,20]⁺ клеток на 14 сутки культивирования (рисунок 5). 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 (рисунок 5).

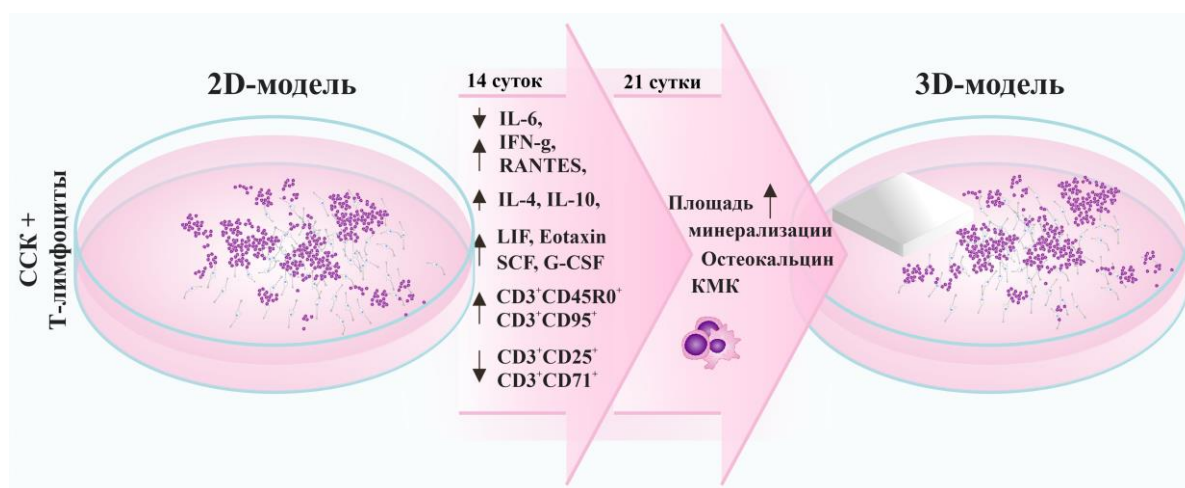


Рисунок 5 - Особенности кооперативного взаимодействия стромальных стволовых и неприлипающих иммунокомпетентных клеток в присутствии трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием, имитирующим регенерирующую костную ткань, по истечении 14 и 21 суток культивирования

Таким образом, 14-ти дневное дистантное *in vitro* сокультивирование ССК с Т-клетками в присутствии трёхмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием способствует формированию специализированных микротерриторий со специфическим микроокружением, регулирующих дифференцировку ССК в остеобласты (рисунок 5).

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 (рисунок 6). 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 (рисунок 6). 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 (рисунок 6). 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 (рисунок 6). 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 Ca^{2+} (рисунок 6).

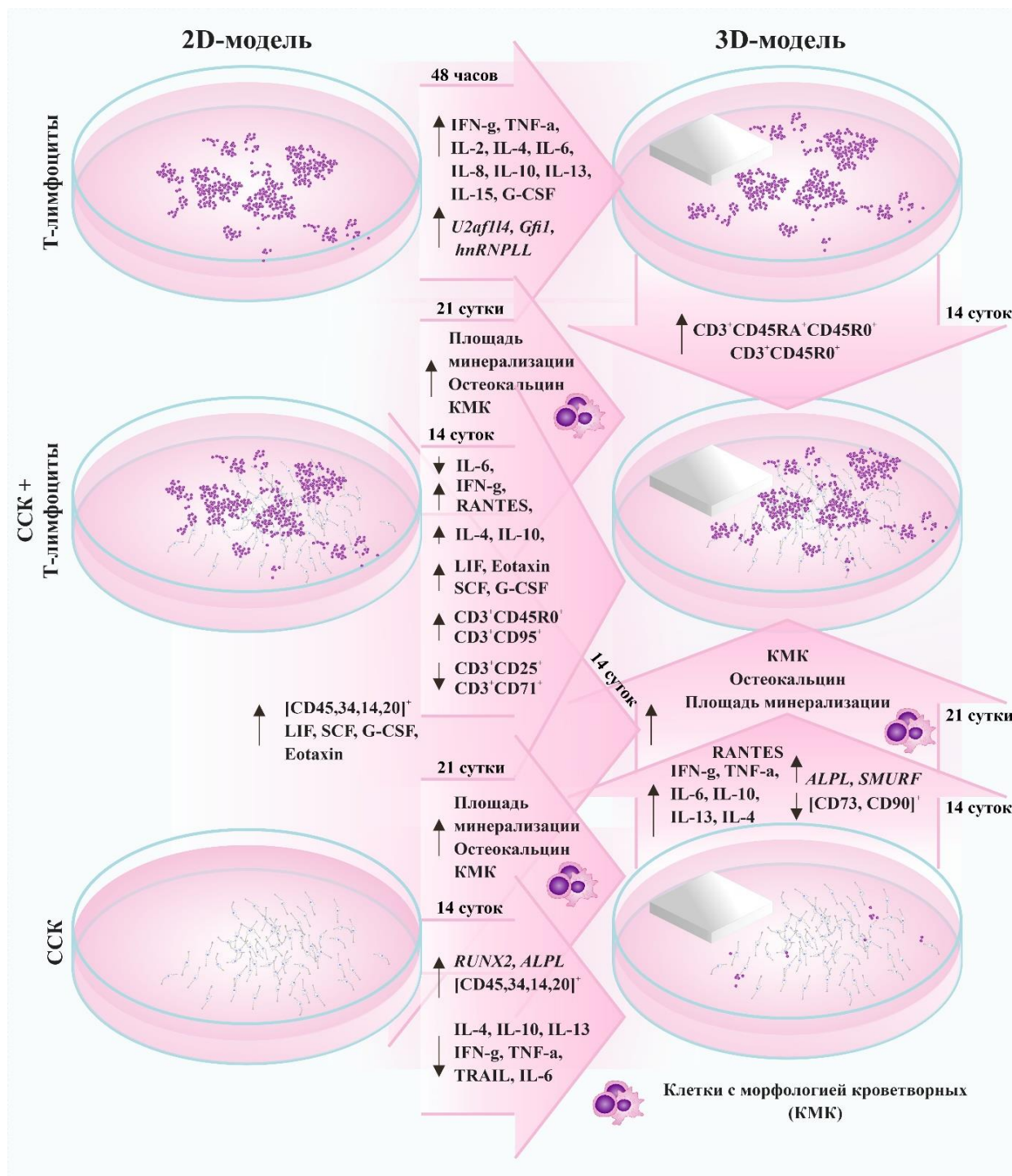


Рисунок 6 - Клеточные и молекулярные аспекты, определяющие формирование эффективной кооперации стромальных стволовых и неприлипающих иммунных клеток крови человека на *in vitro* модели регенерации костной ткани.

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/матрикса.
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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Хлусов И.А. Оценка секреторной реакции мезенхимальных стволовых клеток в двумерных (2D) и трехмерных (3D) культурах // **Гены и клетки**. – 2017. – Т. XII. №3. – С. 278.
2. Литвинова Л.С., **Юрова К.А.**, Шуплецова В.В., Мелашенко Е.С., Хазиахматова О.Г., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П., Хлусов И.А. Новый подход к культивированию иммунокомпетентных клеток на трехмерных образцах, имитирующих минеральный матрикс костной ткани // Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино. – 2017. – С. 430–435.
3. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Мелашенко В.В., Мелашенко Е.С., Шунькин Е.О., Хлусов И.А. Изменение фенотипа ММСК при культивировании с рельефным кальций-фосфатным покрытием // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии», Рязань. – 2017. – С. 78–81.
4. Мелашенко Е.С., Шуплецова В.В., **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Хлусова М.Ю., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Шаркеев Ю.П., Хлусов И.А. Клеточно-молекулярные реакции иммунокомпетентных клеток в трехмерной культуре // Сборник тезисов участников форума «Наука будущего – наука молодых», Нижний Новгород. – 2017. – С. 261–262.
5. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., **Юрова К.А.**, Мелашенко В.В., Мелашенко Е.С., Тодосенко Н.М., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Шунькин Е.О., Хлусов И.А. Изменение поведения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при контакте с синтетическими фосфатами кальция *in vitro* // **Цитология**. – 2017. – Т. 59, №12. – С. 858–866.

(Перечень ВАК РФ; ИФ РИНЦ – 0,721).

6. Литвинова Л.С., **Юрова К.А.**, Шуплецова В.В., Мелашченко Е.С., Хазиахматова О.Г., Шаркеев Ю.П., Хлусов И.А. Краткосрочное культивирование мононуклеарных лейкоцитов с рельефным кальций-фосфатным покрытием на титане // **Медицинская иммунология**. – 2017. – Т. 19 (S). – С. 42–43.

7. Khlusov I.A., Litvinova L.S., Khlusova M.Y., **Yurova K.A.** Concept of Hematopoietic and Stromal Niches for Cell-Based Diagnostics and Regenerative Medicine // **Current pharmaceutical design**. – 2018. – V. 24, №2 6 – P. 3034-3054. (Q2; WoS, Scopus, SJR – 0,580).

8. Khlusov I.A., Dekhtyar Y., Sharkeev Y.P., Pichugin V.F., Khlusova M.Y., Polyaka N., Tyulkin F., Vendinya V., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., **Yurova K.A.**, Prosolov K.A. Nanoscale Electrical Potential and Roughness of a Calcium Phosphate Surface Promotes the Osteogenic Phenotype of Stromal Cells // **Materials** (Basel). – 2018. – V. 11, № 6. – E978. (Q2; WoS, Scopus, SJR – 0,563).

9. Иванюк Е.Э., Надеждин С.В., Покровская Л.А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., **Юрова К.А.**, Мелашченко В.В., Литвинова Л.С., Хлусов И.А. Субпопуляции макрофагов и мезенхимные стволовые клетки в регуляции ремоделирования костной ткани // **Цитология**. – 2018. – Т. 60, № 4. – С. 252–261. (Перечень ВАК РФ; ИФ РИНЦ – 0,721).

10. **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Эффекты γ С-цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на созревание и дифференцировку CD45RO+CD4+/CD8+Т-лимфоцитов in vitro // **Медицинская иммунология**. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 45-52. (Перечень ВАК РФ; ИФ РИНЦ – 0,556).

11. Хлусов И.А., Литвинова Л.С., **Юрова К.А.**, Мелашченко Е.С., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Хлусова М.Ю. Моделирование микроокружения мезенхимных стволовых клеток как перспективный подход к тканевой инженерии и регенеративной медицине (краткий обзор) // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 217-229. (Перечень ВАК РФ; ИФ РИНЦ – 0,19).

12. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., **Юрова К.А.**, Мелашченко Е.С., Хазиахматова О.Г., Шаркеев Ю.П., Хлусов И.А. Новый подход к культивированию иммунокомпетентных клеток // **Биологические мембраны**. – 2018. – Т. 35, № 2. – С. 159–166. (Перечень ВАК РФ; ИФ РИНЦ – 0,19).

13. Литвинова Л.С., **Юрова К.А.**, Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашченко Е.С., Мелашченко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Галецкий М.И., Коржанова М., Хлусов И.А. Дистантное влияние искусственного трехмерного матрикса на остеогенную дифференцировку in vitro культуры ММСК-ЖТ // **Гены и клетки**. – 2018. – Приложение, № 2. – С. 74.

14. Литвинова Л.С., **Юрова К.А.**, Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашченко Е.С., Мелашченко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Норкин И.К., Прокин К.И., Хлусов И.А. Влияние шероховатости искусственного трехмерного матрикса на дифференцировку ММСК в условиях дистантного культивирования in vitro // **Гены и клетки**. – 2018. – Приложение, № 2. – С. 75.

15. Spirina E., Sizikova A., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., **Yurova K.**, Melashchenko E., Dvornichenko M., Khlusov I. Morphofunctional in vitro reaction of

stromal and blood cells on implants for bone tissue engineering // **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. – 2018. – V. 123, Suppl. 3. – P. 14.

16. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Горбунова А.В., Радионова А.А., Горбунова Е.А., Хлусов И.А. Миграторная активность ММСК при сокультивировании с мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* // *Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины, Stemcellbio-2018*, Санкт-Петербург. – 2018. – С. 173.

17. Литвинова Л.С., **Юрова К.А.**, Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Видонова М.А., Хлусова М.Ю., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Хлусов И.А. Влияние трехмерного матрикса с кальций-фосфатным покрытием на морфофункциональную активность мононуклеарных лейкоцитов крови // *Материалы конференции «Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей»*, Рязань. – 2018. – С. 58–60.

18. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., **Юрова К.А.**, Мелашенко В.В., Мелашенко Е.С., Тодосенко Н.М., Хлусова М.Ю., Хлусов И.А. Влияние рельефа кальций-фосфатного покрытия на молекулярные взаимоотношения стромальных и кроветворных стволовых клеток в процессе остеогенеза // *Материалы XI Всероссийского съезда травматологов-ортопедов*, Санкт-Петербург. – 2018. – С. 212–215.

19. Litvinova L., **Yurova K.**, Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Melashchenko E., Todosenko N., Malashchenko V., Shunkin E., Sharkeev Y., Komarova E., Sedelnikova M., Khlusov I. Epigenetic changes of MMSCs under the influence of calcium phosphate coating with different roughness // *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University*. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2018. – P. 83.

20. Khlusov I., Litvinova L., **Yurova K.**, Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Melashchenko E., Pokrovskaya L. Osteogenic-Related Gene Expression by Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells // *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University*. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2018. – P.51

21. Хлусов И.А., Покровская Л.А., Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Мелашенко Е.С., Кудрявцева В.Л., Тимин А.С., Твердохлебов С.И., Сухоруков Г.Б., Аточина-Вассерман Е.Н. Разработка подходов к оптимизации регенерации костной ткани с помощью стромальных стволовых клеток // *Материалы международной научно-практической конференции «Илизаровские чтения»*, Курган. – 2018. – С. 142.

22. **Yurova K.A.**, Khaziakhmatova O.G., Melashchenko E.S., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Shupletsova V.V., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Cellular and molecular basis of osteoblastic and vascular niches in the processes of hematopoiesis and bone remodeling (A short review of modern views) // **Current Pharmaceutical Design**. – 2019. – V. 25, № 6. – P. 663–669. (Q2 WoS, Scopus, SJR – 0,580).

23. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Мелашенко Е.С., Хлусова М.Ю., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., Шаркеев Ю.П., Иванов П.А., Хлусов И.А. Секретция сигнальных молекул кроветворных ниш в условиях остеогенной дифференцировки

мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, индуцированной рельефным кальций-фосфатным покрытием // **Биомедицинская химия**. – 2019. – Т. 65, № 4. – С. 339–346. (Перечень ВАК РФ; ИФ РИНЦ – 0,19).

24. Литвинова Л.С., **Юрова К.А.**, Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Норкин И.К., Прокин К.И., Иванов П.А., Хлусов И.А. Роль трехмерных матриц, имитирующих регенерирующую костную ткань в формировании пула гемопоэтических стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro* // **Российский иммунологический журнал**. – 2019. – Т. 13 (22), №4. – С. 1555–1557.

25. **Юрова К.А.**, Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Шаркеев Ю.П., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Секретция провоспалительных цитокинов клетками, участвующими в регенерации костной ткани // **Гены и Клетки**. – 2019. – Т. XIV, Приложение. – С. 269–270.

26. **Юрова К.А.**, Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Влияние 3D-матриц, имитирующих регенерирующую костную ткань, на дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // **Гены и Клетки**. – 2019. – Т. XIV, Приложение. – С. 269.

27. **Юрова К.А.**, Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Оценка морфологического состояния мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при культивировании в присутствии трехмерных матриц, имитирующих минеральное вещество регенерирующей костной ткани // **Гены и Клетки**. – 2019. – Т. XIV, Приложение. – С. 268.

28. **Юрова К.А.**, Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Шаркеев Ю.П., Мелашенко В.В., Мелашенко Е.С., Иванов П.А., Шунькин Е.О., Хлусов И.А. Влияние 3D-матриц, имитирующих минеральное вещество регенерирующей костной ткани, на функциональную активность лимфоцитов *in vitro* // Сборник трудов XVIII Международной конференции по химии и физикохимии олигомеров. Т.2, Черноголовка: ИПХФ РАН. – 2019. – С. 179–180.

29. **Юрова К.А.**, Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Шаркеев Ю.П., Мелашенко В.В., Мелашенко Е.С., Иванов П.А., Шунькин Е.О., Хлусов И.А. Роль 3D-матриц, имитирующих минеральное вещество регенерирующей костной ткани, в формировании гемопоэтических ниш, обеспечивающих васкуляризацию костной ткани // Сборник трудов XVIII Международной конференции по химии и физикохимии олигомеров. Т.2, Черноголовка: ИПХФ РАН. – 2019. – С. 164–165.

30. Malashchenko V., Litvinova L., Shunkin E., **Yurova K.**, Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Todosenko N., Melashchenko E., Khlusov I. Jurkat cell activity regulation upon co-cultivation with MSC in the presence of a three-dimensional matrix with calcium phosphate coating // Abstract book «Future of biomedicine Conference». – 2019. – P. 39–40.

31. Khlusov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., **Yurova K.A.**, Shunkin E.O., Krivosheev V.V., Porokhova E.D., Sizikova A.E.,

- Safiullina L.A., Legostaeva E.V., Komarova E.G., Sharkeev Y.P. Costimulatory Effect of Rough Calcium Phosphate Coating and Blood Mononuclear Cells on Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro as a Model of In Vivo Tissue Repair // **Materials** (Basel). – 2020. – V. 13, № 19. – P. 4398. (Q2 WoS, Scopus, SJR – 0,563).
32. Litvinova L., **Yurova K.**, Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Shunkin E., Melashchenko E., Todosenko N., Khlusova M., Sharkeev Y., Komarova E., Sedelnikova M., Khlusov I. Gene Expression Regulation and Secretory Activity of Mesenchymal Stem Cells upon In Vitro Contact with Microarc Calcium Phosphate Coating // **International journal of molecular sciences**. – 2020. – V. 21, № 20. – P. 7682. (Q1 WoS, Scopus, SJR – 1,154).
33. **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., Мелашченко Е.С., Литвинова Л.С. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор // **Цитология**. – 2020. – Т. 62, № 5. – С. 305–315. (Перечень ВАК РФ; IF РИНЦ – 0,721).
34. Litvinova L.S., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., **Yurova K.A.**, Melashchenko E.S., Khlusov I.A., Komarova E.G., Chebodaeva V.V., Sharkeev Y.P. Multilevel calcium phosphate coating: A model of bone-like topography for osteoimmunology // **AIP Conference Proceedings**. – 2020. – 2310 (1). – № 020184. (WoS, Scopus, SJR – 0,164).
35. **Юрова К.А.**, Мелашченко Е.С., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Мелашченко О.Б., Шунькин Е.О., Норкин И.К., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Мезенхимные стволовые клетки: краткий обзор классических представлений и новых факторов остеогенной дифференцировки // **Медицинская иммунология**. – 2021. – Т. 23, № 2. – С. 207–222. (Перечень ВАК РФ; IF РИНЦ – 0,556).
36. **Yurova K.A.**, Melashchenko E.S., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Shunkin E.O., Norkin I.K., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Osteogenic differentiation factors of multipotent mesenchymal stromal cells in the current understanding // **Current Pharmaceutical Design**. – 2021. – V. 27, № 35. – P. 3741–3751. (Q2 WoS, Scopus, SJR – 0,580).
37. Иванов П.А., **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Щуплецова В.В., Малащенко В.В., Шунькин Е.О., Норкин И.К., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Роль мезенхимных стромальных/стволовых клеток в регуляции кроветворения в 3D-культуре in vitro // **Российский иммунологический журнал**. – 2021. – Т. 24, № 2. – С. 153–160. (Перечень ВАК РФ; IF РИНЦ – 0,225).
38. Литвинова Л.С., **Юрова К.А.**, Щуплецова В.В., Газатова Н.Д., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., Мелашченко Е.С., Хлусова М.Ю., Хлусов И.А. Значение выбора питательной среды для результатов длительного in vitro культивирования лейкозных Т-лимфоцитов // **Медицинская иммунология**. – 2021. – Т. 23. – № 3. – С. 593-604. (Перечень ВАК РФ; IF РИНЦ – 0,556).
39. **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Шунькин Е.О., Мелашченко Е.С., Норкин И.К., Иванов П.А., Кривошеев В.В., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Роль компонентов искусственных матриц, применяемых для регенеративной медицины, в борьбе с перипротезной инфекцией // **Гены и Клетки**. – 2021. – Т. 16, № 2. – С. 10-22. (Перечень ВАК РФ; IF РИНЦ – 0,914).

40. **Yurova K.A.**, Litvinova L.S., Khlusov I.A. Development of titanium implants with a rough calcium phosphate surface to control the morphofunctional state of stem cells // **Key Engineering Materials**. – 2021. – Т. 887. – С. 40–45.
41. Khlusov I.A., Litvinova L.S., **Yurova K.A.**, Khlusova M.Y. Precise tissue bioengineering and niches of mesenchymal stem cells: Their size and hierarchy matter // **Biocell**. – 2022. – V. 46, № 6. – P. 1365–1373. (WoS, Scopus, SJR – 0,231).
42. Ivanov P.A., **Yurova K.A.**, Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Shunkin E.O., Malaschenko V.V., Norkin I.K., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Comparative analysis of the features of the formation of the extracellular matrix of bone tissue in 2D and 3D models of in vitro cultivation // **AIP Conference Proceedings**. – 2022. – V. 2467. – С. 070059. (WoS, Scopus, SJR – 0,164).
43. **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Особенности формирования внеклеточного матрикса костной ткани в 2D- и 3D- моделях культивирования in vitro // В сборнике докладов: VII Съезд физиологов СНГ, Сочи. – 2022. – С. 95.
44. **Юрова К.А.**, Норкин И.К., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Мелащенко О.Б., Иванов П.А., Лигатюк Д.Д., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Взаимовлияние МСК и мононуклеарных клеток крови при сокультивировании in vitro в присутствии трехмерного искусственного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань // **Российский иммунологический журнал**. – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 443–448. (Перечень ВАК РФ; IF РИНЦ – 0,225).
45. **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Мелащенко О.Б., Лигатюк Д.Д., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Остеодифференцировочный потенциал смешанной культуры ММСК и мононуклеарных клеток крови при сокультивировании in vitro в присутствии трехмерного искусственного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань // Сборник материалов; под ред. М.В. Белоусова. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2023. – С. 202–205.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ГСК – гемопоэтические стволовые клетки.
ИК – иммунокомпетентные клетки.
кДНК – копияная дезоксирибонуклеиновая кислота.
КФ – кальций-фосфатный.
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота.
ППС – полная питательная сред.
ПЦР – полимеразная цепная реакция.
ССК – стромальные стволовые клетки.
ССК+ИК – смешанная культура стромальных стволовых клеток и иммунокомпетентных клеток крови человека.
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.
CD – (англ. *cluster of differentiation*) – кластер дифференцировки.
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.
IFN – (от англ. *interferons*) – интерферон.
IL – (от англ. *interleukin*) – интерлейкин.
LIF – (от англ. *leukemia inhibitory factor*) – лейкемия-ингибирующий фактор.
PTPRC – (от англ. *protein tyrosine-phosphatase, receptor type*) – белок тирозиновая фосфатаза, рецепторный тип.
RUNX2 – (от англ. *runt-related transcription factor 2*) – Runt-связанный фактор транскрипции 2.
SCF – (от англ. *stem cell factor*) – фактор стволовых клеток.
SMURF1 – (от англ. *SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1*) – SMAD-специфическая E3-убиквитин-протеинлигаза 1.
TCR – (от англ. *T-cell receptor*) – T-клеточный рецептор.
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.

Юрова Кристина Алексеевна

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

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени доктора
медицинских наук

1.5.22 – Клеточная биология

Подписано в печать 27.12.2023

Формат 60x90 1/16. Усл. печ. листов 3,0

Тираж 100 экз. Заказ №____

Отпечатано в Полиграфическом центре
Балтийского федерального университета им. И. Канта
236001, г. Калининград, ул. Гайдара, 6