

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования "Балтийский федеральный
университет имени Иммануила Канта"**

На правах рукописи

**Шунькин Егор Олегович
«МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ СТРОМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ТРЕХМЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ
РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ»**

1.5.5. Физиология человека и животных

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Л.С. Литвинова

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор И.А. Хлусов

Калининград – 2021

Оглавление

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
Введение	6
ГЛАВА 1 Обзор литературы.....	13
1.1 Свойства стромальных стволовых клеток	14
1.1.1 Онтогенез стромальных стволовых клеток	15
1.1.2 Иммунофенотип стромальных стволовых клеток	16
1.1.3 Влияние микроокружения на клеточные реакции стромальных стволовых клеток	18
1.2 Физиологическая регенерации костных тканей	20
1.2.1 Анатомические особенности и состав костной ткани	21
1.2.2 Остеобласты	22
1.2.3 Остеоциты	23
1.2.4 Остеокласты	26
1.2.5 Костный матрикс	27
1.2.6 Клеточно-молекулярные аспекты/механизмы физиологической регенерации костной ткани.....	28
1.2.7 Клеточно-молекулярные аспекты остеоинтеграции имплантатов как отражение регенерации костной ткани de novo. Процессы остеоиндукции	31
1.3 Свойства инженерных конструкций как внеклеточных матриксов для моделирования регенерации костной ткани	33
1.3.1 Биосовместимость	34
1.3.2 Механические характеристики	35
1.3.3 Структура, пористость	35
1.3.4 Металлические материалы	36
1.3.5 Неметаллические неорганические материалы	37
1.3.6 Синтетические неорганические материалы.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1. Материал исследования	43
2.1.1 Биологический материал для исследования	43
2.1.2 Титановые образцы с кальцийфосфатным покрытием.....	43

2.2. Методы исследования	45
2.2.1 Выделение культуры стромальных стволовых клеток из липоаспирата.....	46
2.2.2 Определение общего числа и жизнеспособности стромальных стволовых клеток	47
2.2.3 Метод определения цитотоксичности образцов	47
2.2.4 Оценка дифференцировочного потенциала выделенного пула клеток	48
2.2.5 Определение иммунофенотипа стромальных стволовых клеток методом проточной цитометрии	48
2.2.6 Анализ принадлежности выделенного пула клеток к ССК	50
2.2.7 Оценка способности стромальных стволовых клеток к миграции с использованием Cell-IQ системы непрерывного наблюдения	52
2.2.8 Оценка <i>in vitro</i> растворимости образцов, концентраций ионов в их экстрактах и супернатантах клеточной культуры	54
2.2.9 Анализ экспрессии генов.....	55
2.2.10 Количественное определение факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов методом проточной флуориметрии	57
2.2.11 Определение способности стромальных стволовых клеток формировать <i>in vitro</i> трехмерную остеогенную культуру с помощью образцов с КФ-покрытием на титановой подложке.....	58
2.2.12 Оценка влияния гидроксиапатита на миграцию стромальных стволовых клеток с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP	59
2.2.13 Методы статистического анализа данных	60
ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований.....	62
3.1 Способность стромальных стволовых клеток жировой ткани человека формировать <i>in vitro</i> трехмерную остеогенную культуру с помощью образцов с КФ-покрытием на титановой подложке.....	62
3.2 Жизнеспособность стромальных стволовых клеток в <i>in vitro</i> условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани	65
3.3 Результаты растворимости 3D матрикса, имитирующего минеральное вещество костной ткани.....	65
3.4 Иммунофенотип стромальных стволовых клеток в <i>in vitro</i> условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани.....	66
3.5 <i>In vitro</i> минерализация трехмерных культур стромальных стволовых клеток в условиях сокультивирования с матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани	67

3.6 Секрция факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в культурах стволовых стромальных клеток, их связь с экспрессией генов в <i>in vitro</i> условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани.....	69
3.7 Экспрессия генов в стромальных стволовых клетках в <i>in vitro</i> условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани	73
3.8 Адгезия, морфология, миграция (таксис) и пролиферация стромальных стволовых клеток в <i>in vitro</i> условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани ..	75
3.9 Инвазия ССК через микропоры с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP.....	81
ГЛАВА 4. Обсуждение результатов	83
4.1 Способность стромальных стволовых клеток жировой ткани человека эмигрировать с рельефного КФ покрытия на титановой подложке и формировать <i>in vitro</i> трехмерную остеогенную культуру	84
4.2 Роль биодegradации КФ матрикса в способности стромальных стволовых клеток жировой ткани человека формировать <i>in vitro</i> остеогенную культуру	85
4.3 Роль сети межмолекулярных взаимодействий в механизмах морфофункциональных реакций стромальных стволовых клеток жировой ткани человека в <i>in vitro</i> условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
ВЫВОДЫ.....	94
Список литературы	95

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

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

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

АТФ- аденозинтрифосфат

ГАП- гидроксиапатит

ИКМ- индекс клеточной массы

КФ-покрытие- кальцийфосфатное покрытие

ОА-остеоартроз

ОИ-остеоинтеграция

ППС- полная питательная среда

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК- рибонуклеиновая кислота

ССК- стромальные стволовые клетки

СФВ- стромально-васкулярная фракция

ЭДТА- этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭТС- эмбриональная телячья сыворотка

ALPL- ген щелочной фосфатазы

BGLAP- ген остеокальцина

BMP- костный морфогенетический белок

CD- кластер дифференцировки

DDR- дискоидиновый рецептор

FGF- фактор роста фибробластов

GRO α - связанный с ростом онкоген - α , хемокиновый лиганд 1

HGF- фактор роста гепатоцитов

hTERT- ген обратной транскриптазы теломеразы

OPN- остеопонтин

PBS- фосфатно-солевой буфер

RTCA- электродная система непрерывного наблюдения xCELLigence

RUNX2- Runt-связанный фактор транскрипции 2

TiКФ-образцы с титановой подложкой и кальцийфосфатным покрытием

VEGF- фактор роста эндотелия сосудов

Введение

Актуальность темы исследования. Костная ткань, благодаря клеточному составу, обладает значительной способностью к физиологической и репаративной регенерации посредством сложной интеграции резидентных и мигрирующих клеток мезенхимного происхождения, факторов роста и внеклеточного матрикса. Примерно 25% губчатой кости и 3% кортикальной кости подвергаются физиологической регенерации каждый год (Wang W., Yeung K.W.K., 2017). В связи с низкой скоростью образования новой костной ткани (3-4 года для губчатой и не менее 10 лет для ламинарной кости) (Риггз Б., Мелтон III, Джозеф Ф., 2000), обусловленной динамическим равновесием процессов остеогенеза/остеолизиса, физиологическую регенерацию очень трудно изучать и моделировать.

В связи с этим, основное внимание исследователей сосредоточено на репаративной регенерации костной ткани, которая является онтологическим повторением событий, происходящих во время эмбрионального развития скелета (Einhorn T.A., Gerstenfeld L.C., 2015; Wang W., Yeung K.W.K., 2017). Регуляция, а по возможности, контролируемая стимуляция регенерации костной ткани, в том числе, с применением тканеинженерных конструкций (скаффолдов, матриксов), являются важнейшими задачами современной физиологии, тканевой инженерии и регенеративной медицины.

В последние годы структурно-функциональная имитация межклеточного матрикса тканей с помощью разнообразных искусственных биосовместимых материалов является одним из ведущих направлений фундаментальных и прикладных исследований [Ratner V. et al., 2004].

Миграция, пролиферация, дифференцировка и созревание стромальных стволовых клеток (ССК) являются ключевыми событиями, которые, совместно с реваскуляризацией и ремоделированием внеклеточного матрикса, инициируют успешный регенеративный процесс (Schmidt-Bleek K. et al., 2015). В отличие от репаративных процессов, протекающих в различных внутренних органах взрослого человека, которые завершаются, как правило, формированием рубца, воспаление и регенерация в кости приводит к образованию новой костной ткани (Hoff P. et al., 2016).

По мнению большинства исследователей, основные события, отвечающие за успешное ремоделирование костной ткани, происходят на границе раздела тканей и клеток, с одной стороны, и поверхности и/или объема искусственных межклеточных матриц, с другой (Ayoub A., Al-Fotawei R., 2015) Хорошо известна способность СКК дифференцироваться в остеогенном направлении при контакте с гидроксиапатитом и другими фосфатами кальция, составляющими минеральное вещество костной ткани. Наблюдается возрастающая публикационная активность в области клеточно-молекулярных механизмов регенерации костной ткани, в том числе, индуцированных имплантируемыми биоматериалами (Humbert P. et al., 2019; Murr L.E., 2019; Шаркеев Ю.П. et al., 2014).

Тем не менее, морфофункциональная реакция СКК в условиях контакта с трехмерными (3D) тканеинженерными конструкциями, имитирующими межклеточный матрикс, остается во многом не ясной.

Степень разработанности темы. При регенерации костной ткани включается сложная кооперация стволовых клеток и межклеточного матрикса, необходимая для активации и реализации процессов остеогенеза. СКК из костного мозга и жировой ткани наиболее часто изучаются *in vitro* и *in vivo* и применяются для активации регенерации опорно-двигательного аппарата и тканей мезенхимного происхождения (Gamie Z. et al., 2012; Kabat M. et al., 2020). В целом, пул СКК костного мозга проявляет выраженную остеогенную активность вследствие естественного костного микроокружения и присутствия в клеточной популяции преостеобластов (Im G. et al., 2005). В свою очередь, СКК жировой ткани позволяют изучать остеогенные реакции именно стволовых клеток, поскольку не содержат примеси остеобластов; они выделяются из организма менее травматичным способом, более практичны в масштабировании и практическом применении (Liao H.T, Chen C.T., 2014).

Нерешенным и противоречивым вопросом остается способность СКК жировой ткани человека индуцировать рост костной ткани, существующие данные весьма противоречивы (Liao H.T, Chen C.T., 2014). Мало известно о 3D культурах СКК жировой ткани человека *in vitro*, а также о механизмах остеоиндукции, развивающейся при контакте СКК с материалами, моделирующим межклеточный матрикс костной ткани. Необходимы дальнейшие всесторонние исследования с использованием новых экспериментальных моделей.

В этом плане удобным физиологическим остеогенным раздражителем [15], хорошо изученным на протяжении 20 лет, имитирующим структурно-функциональное состояние минерального вещества костной ткани, являются микродуговые кальцийфосфатные (КФ) материалы (Sharkeev Y.P. et al., 2019; Шаркеев Ю.П. др., 2014).

Цель исследования: изучить морфофункциональные реакции стромальных стволовых клеток жировой ткани человека в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани.

Задачи исследования:

1. Провести комплексную оценку морфофункционального состояния (жизнеспособность, морфология, миграция, инвазия, пролиферация, дифференцировка, созревание, секреторная активность) стромальных стволовых клеток в *in vitro* условиях 3D-моделирования регенерации костной ткани.

2. Провести сравнительный анализ поведения стромальных стволовых клеток в 2D- и 3D-культурах.

3. Выявить основные механизмы регенерации костной ткани в *in vitro* модели 3D-культивирования стромальных стволовых клеток жировой ткани человека.

Научная новизна

Впервые показано, что биосовместимые образцы с КФ покрытием, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани, способствуют формированию в течение 14-21 суток *in vitro* культивирования 3D-культуры стромальных стволовых клеток (ССК) жировой ткани человека по типу "ползучего остеогенеза" на основе межклеточной и молекулярной кооперации стволовых клеток и природного/синтетического межклеточного матрикса. Оригинальными являются результаты, свидетельствующие о значительных морфофункциональных изменениях ССК в трехмерной *in vitro* системе (в сравнении со стандартной культурой клеток на пластике): снижение горизонтальной миграции клеток при мониторинге в Cell-IQ системе видеонаблюдения; падение их вертикальной инвазии через микропоры в RTCA системе мониторинга клеток в режиме реального времени; уменьшение числа клеточных делений и экспрессии маркеров стволовости (CD73, CD90 и CD105); повышение экспрессии мРНК остеогенных генов *RUNX2*, *BMP6* и *ALPL*; изменение секреторного профиля клеток (IL-2R α , IL-16, IL-18, HGF, GRO α); формирование кальцифицированного межклеточного матрикса. Полученные комплексные данные

свидетельствуют в пользу активной дифференцировки ССК жировой ткани человека в секретирующие остеобласты в *in vitro* условиях 3D- моделирования регенерации костной ткани. Обнаружен новый механизм образования остеогенной 3D-культуры ССК *in vitro*: образование остеобластов вокруг тестируемых образцов опосредовано не только высвобождением ионов кальция и фосфора с растворимого КФ покрытия, но также: клетками, предифференцированными в остеобласты при прямом контакте с КФ поверхностью и эмигрирующими на пластик; аутокринной и паракринной сетью цитокинов/хемокинов, секретируемых растущей клеточной культурой и участвующих в остеогенезе.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты доказывают способность стромальных стволовых клеток жировой ткани человека к остеоиндукции в трехмерной *in vitro* модели, приближенной к условиям *in situ*. Фундаментальные знания раскрывают новые механизмы трехмерной физиологической регенерации тканей, уточняют процессы, протекающие на межфазных границах между стромальными стволовыми клетками и синтетическим аналогом природного межклеточного вещества костной ткани. Полученные данные формируют фундаментально-прикладной вектор к изучению реальных регуляторных закономерностей регенерации *in vivo*, которые могут лежать в основе научно-технологического прорыва в области трехмерной физиологии, клеточной биологии, тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Практическая значимость исследования обусловлена разработанным алгоритмом, пригодным при персонализированном тестировании материалов и имплантатов для решения прикладных задач прецизионной биоинженерии костной ткани.

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе в медицинском институте и Институте Живых Систем БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам выбраны высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись в современном Центре иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта. В качестве материала для исследования использовали липоаспират здоровых доноров. Объектом исследования являлась трехмерная культура стромальных стволовых клеток,

выделенная из липоаспирата. В качестве раздражителя, способствующего формированию 3D-культуры ССК, применяли образцы ($10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$), выполненные в виде подложек из коммерчески чистого титана, несущих двухстороннее рельефное (индекс шероховатости $R_a=2,4-4,4$ мкм) КФ покрытие. Образцы приготовлены в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск.

Основные методы исследования:

1. Оценка жизнеспособности клеточных культур с использованием счетчика клеток и анализатора жизнеспособности клеток Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, США).
2. Оценка поверхностных маркеров выделенных и культивировавшихся клеток на соответствие критериям принадлежности к ССК, методом проточной цитофлуориметрии;
3. Культуральные методы исследования;
4. Оценка числа делений, миграционной активности ССК с использованием визуальной системы непрерывного видеонаблюдения - интегрированной платформы Cell-IQ® (CM Technologies, Финляндия)
5. Определение содержания про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в плазме крови (Bio-Plex® 200 Systems, Bio-Rad, США)
6. Оценка инвазии клеток с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP (Roche, Швейцария).
7. Оценка уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени.
8. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту

- 1) В двумерной 14-21-суточной *in vitro* культуре стромальных стволовых клеток жировой ткани человека слабо экспрессируют гены остеобластов *RUNX2*, *BMP6* и *ALPL*, сохраняют маркеры стволовости, активно мигрируют и пролиферируют, но не формируют минерализованный костный матрикс.
- 2) Основными гуморальными механизмами регенерации костной ткани в *in vitro* модели 3D-культивирования клеток стромальных стволовых клеток на кальцийфосфатном матриксе является высвобождение ионов кальция и фосфора и формирование трехмерной сети регуляторных цитокинов/хемокинов; клеточные

механизмы включают эмиграцию стромальных стволовых клеток с растворимой кальцийфосфатной поверхности, активное заселение пластиковой поверхности лунок планшетов, дифференцировку и созревание в остеобласты.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов (культуральные методы исследования, проточная цитофлуориметрия, автоматизированные способы клеточной визуализации в реальном времени, электронная микроскопия) и методических подходов, высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на 11 международной конференции «Тканевая инженерия и регенеративная медицина» (г. Рим, Италия, 2018), Всероссийской конференции "Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей" (г. Рязань, 2018), IV Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва, 2019), Международной конференции «Будущее биомедицины — Future of biomedicine» (г. Владивосток 2019), VIII Международной конференции по химии и физикохимии олигомеров (г. Нижний Новгород, 2019), Пятой научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология для практикующих врачей» (29 сентября - 5 октября 2019 г., Сочи), Шестой научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (г. Сочи, 2020), XVI Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (г. Челябинск, 2021), 3-ей международной конференции «Агробизнес, экологический инжиниринг и биотехнологии» (г. Красноярск, 2021). Работа осуществлена при финансовой поддержке Российского научного фонда (16-15-10031), Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ (НШ-2495.2020.7) и Государственного задания (№ FZWM-2020-0010).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 6 полнотекстовых статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, 8 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 11 таблицами. Библиографический указатель включает 244 источника (7 - отечественных и 237 - иностранных).

Личный вклад автора

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

ГЛАВА 1 Обзор литературы

Благодаря клеточному составу, кость обладает значительной способностью к физиологической и репаративной регенерации посредством сложной интеграции различных клеток мезенхимного происхождения, факторов роста и внеклеточного матрикса. Композитный матрикс кости состоит в основном из коллагена, который составляет приблизительно 10% от массы взрослой кости, и минерального (неорганического) вещества, состоящего, преимущественно, из ГАП и трикальцийфосфата (около 65% массы взрослой кости). Вода составляет примерно 25% от массы костной ткани взрослого человека. Коллагеновые волокна придают кости эластичность и большую прочность на разрыв, в то время как фосфаты кальция способствуют ее высокой прочности на сжатие (Merolli A. et al., 2010; Merolli A., Santin M., 2009).

Сформированная кость поддерживается в рабочем состоянии двумя процессами-моделированием и ремоделированием (Lieberman J.R., Friedlaender G.E., 2005; Wang W., Yeung K.W.K., 2017). В процессе моделирования новая кость формируется без предварительной фазы резорбции, тогда как в процессе ремоделирования кости формирование новой костной ткани следует за резорбцией старого костного матрикса (Merolli A., Santin M., 2009). Процесс моделирования кости наблюдается, в основном, в период активного роста и сопровождается изменением формы, размера и пропорций кости. В зрелом возрасте этот процесс позволяет адаптироваться к функциональным нагрузкам (Wang W., Yeung K.W.K., 2017).

Ремоделирование кости происходит благодаря скоординированному функционированию трех клеточных популяций: остеокластов, которые разрушают старую кость; остеобластов, формирующих новую кость; остеоцитов, замурованных в костном матриксе, играющих важную роль в метаболизме костного матрикса, паракринной передаче сигналов и механотрансдукции. Как регуляторы минерального обмена, остециты координируют активность остеобластов и остеокластов в ответ на механические раздражители (Bellido T., 2014). Остеобласты, производные ССК, секретируют органический костный матрикс и способствуют его минерализации (Harada S., Rodan G., 2003). Во время заключительной фазы ремоделирования кости остеобласты подвергаются апоптозу или внедряются в костный

матрикс и созревают в остециты во время процесса кальцификации, опосредованного щелочной фосфатазой (Walsh M.C. et al., 2006; Marie P.J., Kassem M., 2011).

Динамическое равновесие процессов остеогенеза/остеолизиса эффективно предотвращает переломы кости, за исключением случаев экстремальной нагрузки, превышающей биомеханические свойства кости, или постепенно накапливающегося повреждения (усталостных переломов) при циклической нагрузке (Doblaré M. et al., 2004; Wang W., Yeung K.W.K., 2017).

Посттравматическое заживление кости (репаративная регенерация) является онтологическим повторением событий, происходящих во время эмбрионального развития скелета из стволовых клеток, что, во многих случаях, позволяет поврежденному органу полностью восстановить свой состав, структуру и функцию (Einhorn T.A., Gerstenfeld L.C., 2015; Wang W., Yeung K.W.K., 2017).

Формирование скелетных элементов начинается с процесса клеточной конденсации, когда мезенхимные клетки мигрируют и пролиферируют до образования межклеточных контактов посредством экспрессии молекул адгезии (Hall B.K., Miyake T., 2000). Последующее развитие кости происходит через один из двух механизмов: *эндохондральная оссификация* - формирование шаблона хряща и его замена на костную ткань) или *внутримембранозная оссификация* (прямая дифференцировка ССК в преостеобласты).

По типу внутримембранозной (также называемой «дермальной») оссификации развиваются, главным образом, плоские кости, в т.ч. кости черепа, лопатка и нижняя челюсть. Процесс не очень хорошо охарактеризован и до сих пор считается «исключением» в развитии скелета, поскольку большинство костей формируется посредством эндохондральной оссификации (Kronenberg H.M., 2003).

1.1 Свойства стромальных стволовых клеток

Стромальные стволовые клетки являются гетерогенной популяцией клеток, способной к дифференцировке в три основных клеточных типа *in vivo* и в 11 типов *in vitro* (Zuk P.A. et al., 2001), а также к самоподдержанию в недифференцированном состоянии и миграции в область поврежденных тканей (English K., 2013). Этот тип клеток был найден во многих органах и тканях животных и человека в постнатальном периоде развития, таких как: костный мозг, жировая ткань, скелетные мышцы, легкие, пульпа зуба, плацента (Fellows C.R. et al., 2016; Anker P.S. et al., 2004), нервная ткань

(Peng K.Y. et al., 2016), эндокринные железы (Phadnis S.M. et al., 2011).

Определение границ пластичности различных типов клеток, в частности ССК, является одной из актуальных задач регенеративной медицины (Васильев А.В. и др., 2016). Выявлен ряд молекулярно-генетических факторов, определяющих мультипотентность клеток стромы в постнатальном периоде, а также способствующих их гомеостатическому равновесию.

Показана взаимосвязь ССК с механизмами воспаления, где они могут выступать в роли иммуномодуляторов (Dazzi F. et al., 2012; English K., 2013). Использование ССК в качестве иммуносупрессоров в терапии аутоиммунных расстройств и в реакциях отторжения, основано на ингибировании пролиферации Т- и В-клеток, дендритных клеток и естественных киллеров (Glennie S. et al., 2005; Васильев А.В. и др., 2016)

По-видимому, ССК можно рассматривать как важнейший компонент регенеративной системы, направленный на функциональное восстановление повреждённых органов. Вышесказанное подтверждает тот факт, что в протоколах по использованию стволовых клеток в клинических исследованиях, ССК в большей степени, рассматриваются в качестве основного инструмента репаративных процессов.

1.1.1 Онтогенез стромальных стволовых клеток

Популяция ССК происходит от тканей мезенхимы или эмбриональной соединительной ткани. Эта группа клеток присутствует в развивающемся эмбрионе, в основном, в третьем зародышевом слое - мезодерме. Во время развития эти клетки мигрируют и распространяются по всему телу зародыша. В процессе развития эмбриона, ССК дифференцируются в клеточные линии, дающее начало соединительной ткани у взрослых организмов, таких как кости, хрящи, сухожилия, связки, мышцы и костный мозг.

Мнение о дифференцировке ССК в процессе эмбрионального развития из мезенхимальных клеток широко распространено (Ayoub A., Al-Fotawei R., 2015). Это связано, в частности, с наблюдаемой конвергенцией в экспрессии маркеров, таких как виментин, ламинин $\beta 1$, фибронектин и остеопонтин, которые типичны для клеток мезодермы во время эмбрионального развития, а также характерны для адгезивных клеток стромы костного мозга *in vitro* (Tevlin R. et al., 2014). Однако истинное происхождение ССК неизвестно. В научной периодике имеются сообщения, указывающие на то, что ССК онтогенетически связаны с группой эктодермальных

клеток, происходящих из Sox1+ клеток, которые появляются в развивающейся эмбриональной нейроэктодерме и нервном гребне. Эти клетки населяют костный мозг новорожденного и соответствуют критериям, соответствующим их обозначению как ССК. В процессе онтогенеза, популяция этих клеток исчезает и заменяется клетками другого, неидентифицированного происхождения (Нао J. et al., 2015). Кроме этого, в костном мозге развивающегося эмбриона мыши можно выделить, по меньшей мере, две популяции ССК с высокой экспрессией белка нестина и интенсивностью клеточных делений. Первый происходит из мезодермы, которая не экспрессирует нестин и характеризуется интенсивной пролиферацией и участвует в процессе создания скелета эмбриона. Последний происходит из клеток нервного гребня, который экспрессирует нестин, не делится и остается пассивным во время формирования кости, в то время как во взрослом организме способствует нише гемопоэтических клеток (Pino A.M. et al., 2012).

Таким образом, онтогенез ССК связан с клетками, принадлежащими к разным зародышевым слоям, а их первоисточник определяет роль и функции, которые они играют во взрослом организме. Несмотря на большое количество источников для выделения популяции клеток, подходящим по всем критериям к ССК, они обладают схожими параметрами по ряду функциональных особенностей.

1.1.2 Иммунофенотип стромальных стволовых клеток

Одним из параметров, свойственных ССК человека, является набор поверхностных маркеров, экспрессируемых на поверхности клеток выделенной культуры. Согласно рекомендациям международного общества по клеточной терапии, ССК человека можно идентифицировать по экспрессии набора определенных маркеров клеточной поверхности. В их число входят: CD105+, CD73+, CD90+. При этом исключена экспрессия маркеров гемопоэтических клеток, таких как CD34, CD14 или CD11b-, CD79 или CD19, HLA.-DR-. Также на поверхности ССК экспрессируются и другие маркеры, селекция по которым не позволяет относить культуру клеток к ССК. Для культур клеток, выделенных из разных тканей, фенотипическая картина очень схожая, но не идентичная. На набор поверхностных маркеров может влиять методика выделения, криообработка и условия культивирования клеточных линий (Dominici M. et al., 2006).

Однако экспрессия CD73, CD105 и CD90 свойственна не только популяции ССК.

Популяции эндотелиальных, мышечных клеток и фибробластов также могут экспрессировать эти маркеры (Pham H. et al., 2018). Высоко специфическая сортировка ССК из других клеточных популяций крайне необходима. В настоящее время критический маркер STRO-1 (Ning H. et al., 2011), обладающий высокой специфичностью к ССК костного мозга не включен в рекомендации Международного общества клеточной терапии. Однако этот маркер помогает идентифицировать, изолировать и охарактеризовать стромальные клетки-предшественники. При этом известно, что экспрессия STRO-1 на ССК снижается со временем вместе с экспансией культуры. Несмотря на эти ограничения, маркер STRO-1 остается очень важным, поскольку STRO-1-позитивные клетки обладают свойствами стволовых клеток (Fitter S. et al., 2017).

Уровень мРНК и белка CD146 самопроизвольно снижается при пассировании, а высокая экспрессия CD146 соответствует низкому потенциалу пролиферации, самообновления и остеогенной дифференцировки стромальных стволовых клеток периапикальной кисты человека (hPCy-MSCs) (Paduano F. et al., 2016). Другие методы, основанные на сортировке клеток, использовали экспрессию маркеров, таких как CD49a (Rider D.A. et al., 2007), рецепторы фактора роста тромбоцитов (Wang S. et al., 2018), STRO-3 (Gronthos S. et al., 2008) и W5C5 (Lee B.J. et al., 2016). В случае костного мозга или жировой ткани, CD271 считается важным маркером для выделения ССК (Álvarez-Viejo M. et al., 2015). Однако в некоторых исследованиях сообщалось об отсутствии специфичности этого маркера в ССК, выделенных из пуповинной крови. Другие группы также сообщили об использовании маркеров, таких как D7-FIB (Michalopoulos E. et al., 2012), CD56 (Battula V.L. et al., 2009) и Nestin (Lindsay S.L., Barnett S.C, 2017) для выделения ССК. Таким образом, все больше данных свидетельствуют о том, что ССК можно разделить на множество тканеспецифических популяций. Свойства ССК могут изменяться в зависимости от условий выделения, криоконсервации и условий ведения клеточных линий. Иммунофенотипы конкретных культур могут незначительно отличаться между собой, но для идентификации этих культур как ССК необходимо соответствие минимальным критериям Международного общества по клеточной терапии, а именно положительная экспрессия CD105, CD73 и CD90 и отрицательная экспрессия поверхностных молекул CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79 α или CD19 и HLA-DR.

1.1.3 Влияние микроокружения на клеточные реакции стромальных стволовых клеток

ССК в микроокружении ниш стволовых клеток являются регуляторами гомеостаза и регенерации тканей. Ниша необходима для функционирования стволовых клеток, поскольку она поддерживает пулы стволовых клеток и регулирует поведение клеток, в соответствии с соседними и отдаленными сигналами (Méndez-Ferrer S. et al., 2010). После длительного периода культивирования *in vitro* с использованием стандартного 2D метода, ССК теряют многие из своих свойств. Кроме того, методы культивирования ССК в монослое не всегда являются показательными при постановке экспериментов, поскольку *in vivo* ССК располагаются в так называемых нишах (свойственном им специализированном микроокружении, которое интегрирует и осуществляет межклеточные сигналы для регуляции и поддержания гомеостаза принадлежащим ей стволовым клеткам). Именно *ниша* обеспечивает связь между клеточными структурами и организмом в целом, так как в ней содержатся факторы, обеспечивающие жизнедеятельность, определенный фенотипический и метаболический профили клеток. Ниша является матриксным элементом для роста и развития клеток, контролируя и регулируя их месторасположение и ориентацию. С целью *приближения условий in vitro* культивирования к естественным (*in vivo*), были разработаны динамические 3D методы для культур *in vitro* (Lane S.W. et al., 2014).

Тканевой гомеостаз поддерживается за счет динамического равновесия между межклеточным матриксом и клеточными компонентами ткани. Внеклеточный матрикс осуществляет не только организационно-структурную поддержку развития ткани, но и определяет клеточный фенотип и дальнейшую судьбу клеток. Непрерывно протекающие в тканях процессы ремоделирования (локальной резорбции и формирования) нуждаются как в позитивных, так и негативных сигналах от клеток и матричных компонентов ткани. Сопряжение во времени процессов ремоделирования достигается за счет механизма, в основе которого лежит взаимное влияние всех клеток, посредством локальных сигналов факторов роста и других цитокинов (Sims N.A., Martin T.J., 2014; Lu P. et al., 2011). Посредством изменения механического трения, плотности матрикса и тока жидкости, ремоделирование влияет на межмолекулярные расстояния осевых компартментов внутри межклеточного пространства. Это расстояние пространственно настраивается и регулируется для каждой клетки (Ladoux B., Nicolas A., 2012).

Выделяют несколько рецепторных семейств, участвующих в межклеточном взаимодействии, непосредственно в клеточной адгезии участвуют три из них: интегрины (клетка-матрикс), кадгерины (клетка-клетка) и дискоидиновые рецепторы (клетка-коллаген). В то время как роль интегринов в двухмерных культурах хорошо изучена, в 3D культурах они выполняют иную роль. Есть некоторые несоответствия в сигнальных центрах фокальной адгезии, которая образуется как в монослое, так и в 3D культурах.

Дискоидиновый рецептор - мембранный белок, входящий в группу тирозинкиназ, играет роль в межклеточных взаимодействиях. Его влияние зависит от структуры и протеолитического статуса внеклеточного матрикса (Chen S. et al., 2013). DDR рецепторы экспрессируются в широком спектре тканей и на момент активации регулируют клеточную адгезию, пролиферацию и перестройку клеточного матрикса. DDR не активируются факторами роста, но должны специфично соединиться с коллагеновыми лигандами. Два рецептора из этого семейства DDR1 и DDR2 зависят от разного типа коллагена. DDR 2 связывается только с фибриллярными коллагенами (1 и 3 типа).

В отличие от большинства рецепторных тирозинкиназ, DDR в 3D достигает максимальной активации через несколько часов после воздействия коллагена и становится специфично активным только в контакте с коллагеном, находящимся в трехцепочечной структуре. Денатурированные волокна коллагена не способны индуцировать киназную активность, поэтому DDR рецепторы реагируют на протеолитические события во внутриклеточном пространстве (Leitinger B., 2014).

Остеогенез в 2D и 3D культурах реализуется по-разному. В 2D культурах ССК используют интегрины для сцепления с несколькими белками внеклеточного матрикса, к которым относятся коллаген 1 типа, витронектин, ламинин 322. *In vitro*, 2D адгезии с этими белками достаточно для образования адгезированного монослоя и индукции генных маркеров остеогенеза а также минерализации, за счет MAPK сигнального пути, в отсутствие остеогенных факторов.

Анализ роли ERK в коллаген-индуцированном остеогенезе показывает, что сигналинг интегринов не является единственным механизмом, посредством которого ССК взаимодействует со своим матриксом в процессе дифференцировки. После переноса в 3D культуру, ССК не стимулируют экспрессию коллаген зависимых интегриновых рецепторов (Tsai K.S. et al., 2010). Культура ССК, помещенная на 3D

конструкции MC-harv, показывает более высокие уровни трех ранних остеогенных маркеров, а именно RUNX2, ALPL и Osterix / SP7 (Shekaran A. et al., 2015).

Таким образом, в 3D матриксах дифференцировку ССК обеспечивают те же факторы, что и в 2D культурах. Однако сами матриксы в 3D культурах оказывают влияние на процесс дифференцировки (Yeh H.Y. et al., 2014). В 2015 году были созданы 3D конструкции, на которых показано, что остеогенез и пролиферативный потенциал заметно повышается по сравнению с 2D культурами (Holmes B. et al., 2015).

1.2 Физиологическая регенерации костных тканей

Скелет человека, обладая опорными функциями, обеспечивает движение и защиту мягких тканей организма. Костная ткань является вспомогательной нишей для процессов кроветворения, и регулирует процессы эндокринного гомеостаза. К примеру, секретируемый остеобластами остеокальцин участвует в регуляции энергетического обмена, метаболизме глюкозы, регуляции тестостерона (Guntur A.R., Rosen C.J., 2012). Диапазон этих функций критически важен для организма человека. Скелет является чрезвычайно специализированным и динамичным органом, который подвергается постоянной регенерации. Процесс ремоделирования кости отвечает за формирование и поддержание формы кости. Свойство самопроизвольной регенерации костной ткани обеспечивает оптимальную работу основных функций организма. Костная ткань подвержена постоянному динамическому процессу ремоделирования, включающим в себя деградацию старой и образованию новой кости. Отмечается, что данный механизм поддерживает прочность костей на должном уровне (Discher D.E. et al., 2009; Dominici M. et al., 2006). Посредством физиологического ремоделирования костной массы, предотвращается накопление микрповреждений, приводящих к переломам (Arias C.F. et al., 2018).

При критических повреждениях костей, процессы регенерации носят патологический характер, формируя рубцовую ткань в процессе ремоделирования костной ткани и заживления перелома. Заживление перелома комплексный, многофазный процесс, включающий в себя различные типы клеток и клеточных ответов. Анализируя стадии костного заживления, выделяют первичные и вторичные процессы. Первичный процесс заживления характеризуется редуцированием фрагмента трещины костного дефекта, посредством анатомических смещений, жесткой внутренней фиксации и сокращением межфрагментарной деформации. Происходит восстановление

Гаверсовой системы (системы остеонов, являющихся основной функциональной единицей кортикальной кости), позволяющее воссоздавать механическую непрерывность, посредством иннервации кортикальной кости. Вторичное заживление характеризуется динамическими процессами образования гематомы и микродвижениями, зависящими от процессов деконструкции и оссификации раневой области. Эта стадия характеризуется процессами эндохордального (охрящевания) и внутримембранного заживления. В этом процессе участвуют четыре участка костной ткани: кора, надкостница, костный мозг и внешние мягкие ткани.

Выделяют несколько временных стадий заживления перелома: процесс образования гематомы, развитие воспаления, активация процессов ангиогенеза, приводящие к скорейшему образованию хрящевой ткани, а также, последующая консолидация и кальцификация, приводящие к процессам длительного ремоделирования костной ткани (Echeverri L.F. et al., 2015). Данные процессы происходят с участием проангиогенных и остеогенных факторов. В успешности процессов заживления основную роль играет гармонизация физических, гуморальных и клеточных факторов. Стоит отметить, что процессы репаративной регенерации подобны процессам физиологической регенерации, однако протекают более активно.

Таким образом, заживление перелома - сложный физиологический процесс, включающий в себя скоординированное участие гемопоэтических и иммунных клеток костного мозга в сочетании с предшественниками сосудистых и скелетных клеток, включая ССК, мигрирующие из окружающих тканей. Этот каскад молекулярных событий регулируют множество факторов, воздействуя на разные сайты в линии остеобластов и хондробластов, посредством различных процессов, таких как миграция, пролиферация, хемотаксис, дифференцировка, ингибирование и синтез внеклеточного белка. Понимание клеточных и молекулярных путей заживления переломов имеет решающее значение не только для будущего развития терапии переломов, но также может быть полезным для дальнейшего понимания механизмов роста и восстановления скелета, а также механизмов старения.

1.2.1 Анатомические особенности и состав костной ткани

Костная структура, состоящая как из макро- и микромасштабных элементов, является нерегулярной и анизотропной. На макроскопическом уровне компактная наружная кортикальная кость окружает пористую внутреннюю губчатую кость.

Микроскопически, кортикальная кость состоит из повторяющихся единиц остеона, содержащих волокна коллагена и кристаллы фосфата кальция, тогда как губчатая кость представляет собой взаимосвязанный каркас трабекул, окружающий пространство костного мозга. Одна единица остеона состоит из концентрических слоев коллагеновых волокон, называемых ламелями, идущих перпендикулярно центральному каналу, содержащему кровеносные сосуды и нервы (Piard C. et al., 2019).

Кость — это минерализованная плотная соединительная ткань, состоящая в основном из минерального компонента и органического матрикса. Важнейшим структурным элементом костной ткани является внеклеточный матрикс, состоящий на 60% из неорганических компонентов, 30 % органического матрикса, липидов и воды. Важнейшей ролью внеклеточного матрикса является создание платформы для обеспечения структурности минерального компартмента. Ключевую роль в обеспечении механической жесткости кости отводят гидроксипатиту, состоящему из кальция и фосфора. Эластичность и гибкость костной ткани необходима для компенсации физических повреждений и достигается органическим матриксом. В составе органической части внеклеточного матрикса костей выделяют более 100 различных белков, но на коллаген I типа приходится около 85% массы общего костного белка (Salmon C.R. et al., 2013). Коллаген типа I состоит из фибрилл, включающих в себя тройную спиральную структуру длиной 300 нм. Нанокристаллы гидроксипатита внедряются между отдельными молекулами коллагена и служат для увеличения жесткости кости. Вместе с неколлагеновыми белками, такими как фибронектин, остеокальцин, остеопонтин и остеоонектин, коллаген образует основу для минерального осаждения, а протеогликаны, такие как декорин и бигликан, регулируют сборку и диаметр коллагеновых фибрилл. Коллаген типа I равномерно распределяется по всему скелету, тогда как неколлагеновые белки и протеогликаны обнаруживаются в виде нерегулярного распределения (Garnero P., 2015; Wagermaier W. et al., 2015).

1.2.2 Остеобласты

Клеточная фракция костной ткани представлена остеобластическим диффероном и представляет из себя пул стромальных стволовых клеток, из которых посредством остеогенной дифференцировки появляются преостеобласты, затем остеобласты. Остеобласты представляют собой кубоидальные клетки, располагающиеся вдоль поверхности кости. Остеобласты составляют 4–6% от общего количества резидентных

костных клеток, а их основной функцией является формирование костной массы (Capulli M. et al., 2014). Остеобласты являются постмитотическими, терминально не дифференцированными клетками, окруженными костной матрицей. Остеобласты способны к дифференцировке в остециты, которые представляют из себя клетки звездчатой формы, регулирующие обмен костного материала. Остеобласты, остающиеся на поверхности костей, обращенной к надкостнице, могут стать инертными клетками, выстилающими кость или подвергнуться апоптозу. Когда популяция зрелых остеобластов истощается (в результате естественного обмена или регенеративного процесса, требующего массивного рекрутирования), новые остеобласты дифференцируются от мезенхимальных клеток-предшественников. По морфологическим характеристикам эти клетки включает в себя множественный шероховатый эндоплазматический ретикулум и развитый аппарат Гольджи, характеризуются развитым везикулярным аппаратом. (Capulli M. et al., 2014; Marks S.C., Poroff S.N., 1988). Работа секреторного аппарата поляризованных остеобластов направлена на создание костного матрикса посредством формирования остеоида (предшественника костной ткани до стадии минерализации).

Предшественниками остеобластического дифферона являются ССК, дифференцировка которых в остеопрогениторные клетки требует экспрессии специфических генов и синтеза костных морфогенетических белков (*Bmp*), активации сигнального каскада *Wnt* (Grigoriadis A.E. et al., 1988). Экспрессия дистального гомеобокса 5 (*Dlx5*) и остерикса (*Osx*) имеет решающее значение для дифференцировки остеобластов (Ducy P. et al., 1997; Capulli M. et al., 2014). *Runx2* является основным геном дифференцировки остеобластов, о чем свидетельствует тот факт, что *Runx2*-нулевые мыши лишены остеобластов. *Runx2* продемонстрировал активацию генов, связанных с остеобластами, таких как *Col1A1*, *ALP*, *BSP* и *OCN* (Fakhry M. et al., 2013).

1.2.3 Остеоциты

Остеоциты, составляют 90–95% всех костных клеток и являются наиболее распространенными и долгоживущими клетками с продолжительностью жизни до 25 лет (Miller S.C. et al., 1989). Остеоциты расположены в лакунах, окруженных минерализованным костным матриксом, где они проявляют морфологию дендритов (Rocheffort G.Y. et al., 2010; Dallas S.L. et al., 2013). Морфология внедренных остеоцитов различается в зависимости от типа кости. Например, остеоциты из губчатой кости более

округлые, чем остециты из кортикальной кости, которые имеют удлинённую морфологию (Currey J.D., 2003).

Остециты происходят из линии ССК, посредством дифференцировки остеобластов (Franz-Odenaal T.A. et al., 2006). В конце цикла формирования кости, субпопуляция остеобластов становится остецитами, интегрированными в костный матрикс. Этот процесс сопровождается заметными морфологическими и ультраструктурными изменениями, в том числе уменьшением размера круглого остеобласта. Количество органелл, таких как шероховатый эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, уменьшается, а отношение ядра к цитоплазме увеличивается, что соответствует снижению синтеза и секреции белка (Schaffler M.B. et al., 2014).

После терминальной дифференцировки зрелых остецитов в минерализованном костном матриксе, некоторые из ранее экспрессированных маркеров остеобластов, таких как остеокальцин (OCN), костный сиалопротеин 2 (BSPII), коллаген типа I и щелочная фосфатаза (ALP), подавляются. С другой стороны, маркеры остецитов, включая белок дентинового матрикса 1 (DMP1) и склеростин, высоко экспрессированы (Sobhan U. et al., 2009; Lee J.W. et al., 2014; Vignery A. et al., 2011).

Клеточное тело остецитов находится внутри лакуны, его цитоплазматические контакты (до 50 на каждую клетку) создают сеть канальцев в пространстве лакуны, образуя лакуноканаликулярную систему остецитов (Manolagas S., 2006). Эти цитоплазматические канальцы обеспечивают связь между остецитами щелевыми соединениями, а также с цитоплазматическими канальцами остеобластов и клеток выстилки на поверхности кости, способствуя межклеточному транспорту небольших сигнальных молекул, таких как простагландины и оксид азота, между этих клеток. Кроме того, лакуноканаликулярная система остецитов находится в непосредственной близости от сосудистой системы, благодаря чему кислород и питательные вещества достигают остецитов (Dallas S.L. et al., 2013).

Межклеточная связь также достигается за счёт интерстициальной жидкости, протекающей между отростками остецитов и канальцами (Mullender M.G. et al., 1996). С помощью лакуноканаликулярной системы остециты реализуют механосенсорную функцию поскольку их взаимосвязанная сеть способна обнаруживать механические

давления и нагрузки, способствуя адаптации кости к ежедневным механическим воздействиям (Rocheffort G.Y. et al., 2010).

Остеоциты способны участвовать в синтезе и минерализации остеоидного матрикса. Остеоциты синтезируют белки, участвующие в формировании кости, такие как COL-I или OCN, и минерализации, такие как ALP. Более того, они способны индуцировать образование новой кости в местах повреждения посредством рекрутирования стромальных стволовых клеток посредством секреции OPN (Raheja L.F. et al., 2008). Сигнальные молекулы NO и PGE2, высвобождаемые остеоцитами также оказывают прямое анаболическое воздействие на остеобласты (Rocheffort G.Y. et al., 2010).

Экспрессия RANKL и CSF-1 (колониестимулирующий фактор-1, также называемый M-CSF), поддерживает образование остеокластов. Оба они являются необходимыми и достаточными молекулами для развития остеокластогенеза. Остеоциты являются основным источником RANKL (Xiong J. et al., 2011; Nakashima T. et al., 2011) и остеопротегерин (OPG) (Kramer I. et al., 2010). OPG, секретируемый остеобластами и остеоцитами, защищает скелет от чрезмерной резорбции кости, связываясь с RANKL не позволяет образовывать связь с рецептором RANK.

Xiong et al. продемонстрировали, что именно остеоциты поддерживают остеокластогенез, а не остеобласты (Xiong J. et al., 2011). Nakashima et al. обнаружили, что костная масса у генетически модифицированных мышей зависит от остеоцитарного RANKL, поскольку мыши с делецией в RANKL, экспрессируют остеопоротический фенотип (Nakashima T. et al., 2011). Обе исследовательские группы приходят к выводу, что RANKL, полученный из остеоцитов, необходим для нормального ремоделирования кости. Более того, RANKL, продуцируемый остеоцитами, необходим для образования остеокластов в губчатой кости (Xiong J. et al., 2015).

Предполагают, что апоптоз остеоцитов является механизмом не только для восстановления микроповреждений, но и для инициирования процесса ремоделирования. При образовании микротрещины, в костной жидкости снижается уровень кислорода. При этом остеоциты запускают апоптотические процессы, с последующим высвобождением таких медиаторов, как TNF- α , IL-6, IL-11, что вызывает привлечение остеокластов в целях резорбции поврежденной кости, (Murshid S.A., 2017;

Dallas S.L. et al., 2013). Однако источником этих молекул являются не апоптотические клетки, а соседние жизнеспособные остеоциты. Остеоциты также выделяют VEGF, фактор роста сосудов, имеющий решающее значение для неоангиогенеза, который является первым шагом в поступлении остеокластов в поврежденную зону, запуская процесс ремоделирования (Jilka R.L. et al., 2013).

Сеть остеоцитов является источником локальных растворимых факторов, которые участвуют в локальной регуляции резорбции кости (например, RANKL) или образования кости (например, склеростин), системных факторов, которые действуют как гормоны (например, FGF-23). Guo и Bonewald (Guo D., Bonewald L.F., 2009) рассматривают эту сеть как эндокринный орган, который регулирует метаболизм фосфатов с помощью белков FGF-23(фактор роста фибробластов 23), DMP-1 (кислый фосфопротеин дентиновой матрицы 1), PHEX (фосфат-регулирующая нейтральная эндопептидаза) и MEPE (матричный внеклеточный фосфогликопротеин) (Atkins G.J. et al., 2011; Quarles L.D., 2003; Bonewald L.F., 2011; Sapir-Koren R., Livshits G., 2014; Dallas S.L et al., 2013).

Таким образом, остеоциты выступают в качестве организаторов ремоделирования кости посредством регуляции активности остеобластов и остеокластов (Bonewald L.F., 2007; Dallas S.L. et al., 2013). Более того, апоптоз остеоцитов был признан хемотаксическим сигналом остеокластической резорбции кости (Aguirre J.I. et al., 2006; Plotkin L.I., 2014; Bellido T., 2014). В соответствии с этим, было показано, что во время резорбции кости апоптотические остеоциты захватываются остеокластами (Faloni A.P.S. et al., 2007; Cerri P.S. et al., 2003).

1.2.4 Остеокласты

Основными участниками процессов остеорезорбции выступают остеокласты - гигантские многоядерные клетки с большим количеством лизосом, заполненных гидролитическими ферментами. Остеокласты играют ключевую роль в развитии скелета и ремоделировании костей у взрослых, участвуют в патогенезе различных заболеваний костной ткани. Остеокласты дифференцируются из моноцитарно/макрофагальной клеточной линии, при накоплении во внеклеточном матриксе колониестимулирующего фактора моноцитов/макрофагов (M-CSF) и активации рецепторов лиганда NF-κB (RANKL) (Quinn J.M. et al., 1998). M-CSF связывается со своим рецептором c-Fms, для активации различных сигнальных путей и последующей стимуляции пролиферации

предшественников остеокластов, так и зрелых клеток. Функциональный потенциал остеокластов зависит от поляризации клетки, вызванной интегрином $\alpha\beta3$. Было показано, что передача сигналов c-Fms и RANK регулирует резорбцию кости путем перекрестного сигналинга, активированного интегрином $\alpha\beta3$ (Teitelbaum S.L., 2000).

Знание структурной, молекулярной и функциональной биологии кости имеет важное значение для лучшего понимания этой ткани как многоклеточной единицы и динамической структуры, которая также может выступать в качестве эндокринной ткани, функция которой до сих пор мало изучена. Показано, что костные клетки реагируют на различные факторы и сигнальные молекулы, способствуя лучшему пониманию пластичности костных клеток. Кроме того, интегрин-зависимые взаимодействия костных клеток с костным матриксом необходимы для формирования и резорбции кости. Исследования, касающиеся лакуноканаликулярной системы и перичеллюлярной жидкости выявили механосенсорную функцию остеоцитов, необходимую для адаптации кости к механическим воздействиям. Гормоны, цитокины и факторы, которые регулируют активность костных клеток, такие как склеростин, M-CSF, RANKL, ALP, OCN, FGF-23, играют значительную роль в гистофизиологии кости при нормальных и патологических состояниях. Таким образом, более глубокое понимание динамической природы костной ткани поможет разрабатывать новые терапевтические подходы к лечению остеопатологий.

1.2.5 Костный матрикс

Межклеточное вещество костной ткани или костный матрикс характеризуется низким содержанием воды, от 6 до 20%. Костный матрикс на 70% состоит из минеральных солей, главным образом из кристаллов гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Кристаллы гидроксиапатита соединяются собой молекулами коллагена через остеоонектин. Минеральный компонент костного матрикса также включает в себя бикарбонаты, цитраты, фториды, соли ионов Mg, K, Na. Органическим компонентом межклеточного вещества костной ткани выступают коллагены (коллаген типа I, V) и неколлагеновые белки (остеоонектин, остеокальцин, протеогликаны, сиалопротеины, морфогенетические белки, протеолипиды, фосфопротеины (Alford A.I. et al., 2015).

Внеклеточный матрикс представляет собой сложную динамическую биосреду с точно регулируемые механическими и биохимическими свойствами. В кости межклеточный матрикс участвуют в регуляции клеточной адгезии, пролиферации и

ответов на факторы роста, дифференцировки и, в конечном итоге, функциональных характеристик зрелой кости. Костный матрикс может индуцировать образование костной ткани за счет запуска дифференцировки ССК в остеобластном направлении (Lin X. et al., 2020).

1.2.6 Клеточно-молекулярные аспекты/механизмы физиологической регенерации костной ткани

В процессе регенерации костной ткани принимают участие несколько тысяч генов, для которых известны некоторые общие паттерны анатомических и биохимических процессов. Несмотря на жесткость и прочность костной ткани, в нормальном физиологическом состоянии протекают процессы резорбции костной массы остеокластами и ремоделирование костной массы остеобластами. Эти физиологические процессы, происходящие в здоровой скелетной ткани, подобны патологическим процессам при повреждении целостности структуры костной ткани. Отмечено, что кость одна из немногих тканей, где заживление раневой поверхности происходит без образования фиброзного рубца и напоминает процесс первичного развития ткани. Путем сращения и окостенения места перелома, образуется костная ткань, прочность которой сравнима с прочностью первичной ткани.

Выделяют два типа реакций заживления костной ткани: первичное и вторичное. Первичное сращение происходит только при незначительном сдвиге между фрагментами кости или при минимальных деформациях костных фрагментов. Как и при процессах физиологического ремоделирования, так и при переломах, поверхности находятся в тесном контакте и при активном участии систем ангиогенеза, происходит сращивание гаверсовой системы остеонов на межкостном участке для формирования целостной стабильной системы кости. При более серьезных повреждениях костной системы, соединение костных фрагментов происходит за счет вторичного сращивания. Помимо механизма воссоединения кости системами остеонов, в данном процессе участвует эндохордальное окостенение. Оно начинается с острой воспалительной реакции и рекрутирования ССК для генерации первичного хрящевого каллуса. На последующих этапах он реваскуляризуется и кальцифицируется, приводя к полной реконструкции нормальной структуры кости.

В целом, заживление кости представляет собой сложный процесс, который включает в себя множество различных клеток и сигнальных молекул, источником

которых является не только надкостница, кортикальная и губчатая кость, эндост и костный мозг, а также ткани окружающей мышцы.

Кость - хорошо васкуляризированный орган с развитой сосудистой сетью, являющейся поставщиком клеток и сигнальных факторов. Начальная фаза процесса заживления считается одной из важнейших детерминант исхода заживления (Kolar P. et al., 2010). Первой реакцией организма на полученную травму является возникающая гематома, состоящая из клеток периферической и интрамедуллярной (из костного и спинного мозга) крови. Это инициирует воспалительный ответ, необходимый для прогрессирования заживления. Коагуляция гематомы в местах будущего сращения перелома формирует шаблон для образования костной мозоли. Формирование богатой фибрином грануляционной ткани - важный процесс для последующего остеосинтеза. Тканеспецифичные макрофаги, активируемые цитокинами запускающие каскад свертывания в гематоме, удаляют мелкие остатки кости и ткани в месте перелома. Создается воспалительная среда, характеризующаяся увеличением местного кровоснабжения и повышением проницаемости сосудов, приводящая к притоку провоспалительных клеток из кровяного русла и повышению продукции цитокинов.

С началом воспаления начинается регенерация путем миграции стромальных стволовых клеток, эндотелиальных клеток и иммунных клеток в область перелома кости (Oe K. et al., 2007; Kolar P. et al., 2010; Schmidt-Bleek K. et al., 2014).

Мезенхимальные, эндотелиальные и иммунные клетки, попадающие в гематому, внедряются и генерируют внеклеточный матрикс, который эволюционирует в грануляционную ткань до появления мягкого каллуса. Клетки и внеклеточный матрикс, образующие матрицу для последующей регенерации, взаимозависимы. Клетки организуют свою матрицу, содержащую микросреду для передачи сигналов и управления клеточными функциями, такими как пролиферация, дифференцировка и миграция (Hutmacher D.W. et al., 2012). Соседние ткани, в частности костный мозг, являются источником факторов и клеток, проникающих в область поврежденной кости. Исследования показали, что состав костного мозга изменяется в непосредственной близости от перелома, как с точки зрения состава клеток, так и ростовых факторов (Könnecke I. et al., 2014; Kolar P. et al., 2011; Schmidt-Bleek K. et al., 2014).

Фибриновый сгусток, образовавшийся после свертывания, содержит протеазы, факторы роста и цитокины, регулирующие клеточные действия (Schaffer C.J., Nanney

L.V., 1996). На данной стадии заживления проявляют активность нейтрофилы, лейкоциты и макрофаги, инициирующие первые изменения в раннем матриксе путем активации фибробластов, которые в результате высвобождают гиалуронат и гликопротеины (фибронектин) в развивающийся внеклеточный матрикс (Singer A.J., Clark R.A., 1999). При прогрессировании заживления развивается грануляционная ткань, которая в дальнейшем меняет структуру межклеточного матрикса путем секреции протеогликанов и коллагенов.

В то время как вышеописанные воспалительные процессы впоследствии уменьшаются, репаративная фаза начинается параллельно с образованием грануляционной ткани. Когда стромальные стволовые клетки появляются и дифференцируются в фибробласты, они продуцируют белки внеклеточного матрикса, такие как коллагены типа I и II (Wessing B. et al., 2018; Sheikh Z. et al., 2017). Локальная гипоксия способствует образованию и инвазии кровеносных сосудов. ССК дифференцируются в хондрогенные и остеогенные клетки и образуют мягкую костную мозоль обеспечивая первую степень механической стабильности.

На молекулярном уровне эти репаративные процессы опосредованы определенными факторами роста, такими как трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), костные морфогенетические белки (BMP), фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) и производные тромбоцитарного фактора роста (PDGF). TGF- β действует как плеiotропный фактор роста, стимулируя недифференцированную пролиферацию ССК, тогда как BMPs способствуют дифференцировке ССК в хондроциты и остеобласты. FGF и PDGF действуют митогенно на ССК и остеобласты. В то время как FGF является критическим для ангиогенеза, PDGF также действует при хемотаксисе макрофагов. IGF способствует пролиферации и дифференцировке остеопрогениторных клеток (Einhorn T.A., 1998).

Поскольку сам мягкий каллус обеспечивает только базовую механическую стабильность, он подвержен окостенению, которое достигается путем включения фосфата кальция во внеклеточный матрикс. Оссификация различается при внутримембранозном и энхондральном окостенении, которые происходят в разных условиях и могут происходить одновременно в разных зонах места перелома (Einhorn T.A., 1998). При внутримембранной оссификации кости развиваются без хрящевых интермедиатов. После стимуляции ССК дифференцируются в остеобласты, которые

продуцируют внеклеточный матрикс, в основном состоящий из коллагена I типа и других специфических для остеобластов белков, включая остеокальцин. Внеклеточный костный матрикс затем кальцинируется за счет активности остеобластов, которые осаждают кристаллы фосфата кальция во внеклеточном матриксе. По мере того, как остеобласты оказываются «захваченными» кальцифицированным внеклеточным матриксом, они окончательно дифференцируются в механочувствительные остециты. В отличие от внутримембранозной оссификации, при энхондральном оссификации заживление кости достигается за счет хрящевых интермедиатов. Здесь хондроциты, дифференцированные от ССК, продуцируют хондрогенный матрикс, который соединяет перелом (Ford J.L. et al., 2003). В конце концов, хондроциты подвергаются апоптозу.

Наши знания подтверждают важность остеоиммунологических аспектов процесса заживления, в том числе роль первичной гематомы, вызывающую приток воспалительных клеток и последующий каскад цитокиновых реакций, инициирующий рекрутирование клеток в поврежденную ткань. Иммунные клетки и производимые ими цитокины играют важную роль в остеорегенерации. Наряду с факторами роста, цитокины также управляют дифференцировкой остеопрогениторных ССК. Роль различных иммунных клеток и их подтипов в заживлении костей сложна и не до конца понятна. Выявлена роль ССК в регуляции остеореперативных процессов при переломе, заключающаяся в их способности к дифференцировке в костеобразующие остеобласты и хрящобразующие хондроциты. Использование ССК для улучшения заживления переломов имеет огромное клиническое значение. Полное понимание путей, которые управляют пролиферацией и дифференцировкой ССК, не до конца выяснено и необходимо для разработки терапевтических подходов для манипулирования ССК *in vivo*, а также *ex vivo* для имплантации.

1.2.7 Клеточно-молекулярные аспекты остеоинтеграции имплантатов как отражение регенерации костной ткани *de novo*. Процессы остеоиндукции

Остеоинтеграция это динамический процесс, включающий последовательность каскадных реакций, в которых свойства поверхности имплантата играют важную роль. Интеграция имплантата запускает каскад клеточных и внеклеточных биологических событий (Mavrogenis A.F. et al., 2009). Как только имплантат помещается в организм, запускается воспалительная реакция, приводящая к высвобождению различных белков, таких как факторы роста и цитокины, образующие сгусток крови (Terheyden H. et al.,

2012; Liu Y. et al., 2020). Спустя несколько минут белки и липиды будут поглощаться поверхностью имплантата из сгустка крови. Белки, находящиеся на поверхности имплантата, служат сигналом для миграции и пролиферации клеток (Rivera-Chacon D.M. et al., 2013). Конкретные типы белков и прочность адгезии в значительной степени зависят от характеристик поверхности имплантата, таких как топографические особенности, шероховатость и гидрофильность (Boyan B.D. et al., 2017; Pegueroles M. et al., 2012; Gittens R.A. et al., 2014; Wang X. et al., 2016). Впоследствии тромбоциты крови способствуют образованию фибринового матрикса, который служит «мостом» для миграции и прикрепления клеток (Mavrogenis A.F. et al., 2009; Marx R.E., 2004).

Спустя 2–3 дня после имплантации макрофаги и нейтрофилы прилипают к имплантатам через фибриновый «мостик», фagoцитируя патогены и некротические ткани. Происходит процесс разложения сгустка крови и отчистки раны для формирования новых кровеносных сосудов (Caplan A.I., Dennis J.E., 2006; Davies J.E., 2003). Через 4 дня ангиогенез происходит в промежутке между имплантатом и костью хозяина с участием недифференцированных стромальных стволовых клеток, располагающихся вокруг структуры сосуда. Под влиянием факторов роста и цитокинов ССК дифференцируются в остеобласты, которые будут продуцировать внеклеточный матрикс и образовывать незрелую тканую кость (Berglundh T. et al., 2003; Meyer U. et al., 2004). Однако возможна дифференцировка ССК в фибробластидном направлении, что будет стимулировать образование фиброзной мембраны на поверхности имплантата и препятствовать процессу врастания кости (Razzouk S., Schoor R., 2012). На направление дифференцировки ССК влияет свойства поверхности и состав внеклеточного матрикса остеорепаративной ниши (Boyan B.D. et al., 2016; Ma Q.L. et al., 2018).

Формирование первичного каллуса продолжается в течение полутора недель после имплантации. Поскольку направленность миграции ССК регулируется фибриновым мостиком между костью и имплантатом, существует два типа остеогенеза, зависящими от расположения основного пула ССК. Контактный остеогенез определяется как формирование кости, инициированное непосредственно на поверхности имплантата. Дистантный остеогенез возникает на костях или тканях, окружающих имплантат, которые могут мигрировать на поверхность имплантата через фибриновый мостик (Davies J.E., 1996). Choi et al. продемонстрировали, что дистантный и контактный остеогенез разобщены и контактный остеогенез возникает после

индукции дистантного по причине высокого содержания BMP-2 выделяемого процессами дистантного остеогенеза в остеорепаративный очаг (Choi J.Y. et al., 2017).

По прошествии 2-х недель, в пространстве между имплантатом и костью формируется первичный каллус, и для последующей остеоинтеграции запускаются процессы аппроксимации и костного ремоделирования. Во время этого процесса остеокласты резорбируют новообразованную кость, для устранения микротрещин и оптимизации поверхности, для формирования пластинчатой кости (Mulari M.T.K. et al., 2004). Остеокласты создают герметичную зону с специфичной микро и нанотопографией, индуцирующей формирование новой пластинчатой кости посредством биохимических маркеров, содержащихся на раневой поверхности (Minkin C., Marinho V.C., 1999). Гармоничное взаимодействие остеобластов и остеокластов приводит к постепенной трансформации временного первичного каллуса в параллельную волокнистую ткань, а затем и к пластинчатой кости. Этот динамический процесс протекает непрерывно на протяжении года после имплантации, что необходимо для долгосрочной фиксации.

1.3 Свойства инженерных конструкций как внеклеточных матриксов для моделирования регенерации костной ткани

Инженерия костной ткани постоянно развивается с тех пор, как была предложена концепция «тканевой инженерии». Состав и структура биоматериалов, которые используются в качестве материала для изготовления каркасов, играют жизненно важную роль в инженерии костной ткани. В процессах регенерации костной ткани задействовано много физиологических факторов, опосредующих взаимодействия клеточного звена с субстратом. Оптимальным неорганическим матриксом можно считать материал, стабилизирующий баланс между остеокластами и остеобластами при различных условиях окружающей среды (Lemaire V. et al., 2004).

В настоящее время терапевтические стратегии, основанные на пересадке кости с использованием аутотрансплантата или аллотрансплантата, выявляют некоторые недостатки. До сегодняшнего момента, использование аутотрансплантата является золотым стандартом для замещения костных дефектов, однако данная методика имеет ряд существенных недостатков, таких как - высокая инвазивность имплантационных процедур, топографические проблемы, недостаточность объемов аутогенной кости, которая может быть извлечена из гребня подвздошной кости. Кроме того, у метода присутствуют хирургические риски, такие как кровотечение, воспаление, инфекция и

хроническая боль, а также повреждение, деформация, гиперчувствительность и рубцевание донорского участка [36]. Аллотрансплантаты (имплантаты от донора) также имеют некоторые ограничения, такие как отсутствие доноров, высокая стоимость, необходимость стерилизации и риск передачи инфекционного агента или иммуноопосредованного отторжения тканей [140]. Эти ограничения и недостатки, связанные с подходами ауто- и аллотрансплантата, указывают на клиническую необходимость альтернативных терапевтических стратегий, направленных на остеорегенеративные процессы. Таким образом, в тканевой инженерии используются новые биоматериалы/скаффолды в сочетании со стволовыми клетками и факторами роста для улучшения восстановления костей.

Термин скаффолд используется для трехмерного (3D) биоматериала, который обеспечивает подходящую клеточную среду для регенерации тканей и органов. Задача ученых состоит в том, чтобы создать скаффолд, способный усиливать регенераторный клеточный потенциал и моделировать естественное поведение включением биоматериалов, схожими с природными средами (Dhandayutharani V. et al., 2011). Разработка способов производства многофункциональных скаффолдов, эффективных с точки зрения коммерции и клинического использования, является актуальной проблемой (Yu J. et al., 2018).

1.3.1 Биосовместимость

Любой внедряемый имплантат чужероден по отношению к организму, поэтому каждый используемый матрикс должен быть биосовместим. Биосовместимость подразумевает отсутствие токсичности, тератогенности, воспалительной реакции, гемолиза, реакций коагуляции. В частности, продукты деградации скаффолда должны поддерживать нормальную клеточную активность, и не быть токсичным для ткани хозяина (Tang D. et al., 2016). Материал, имплантированный в организм, не должен вызывать или рецидивировать хроническую инфекцию. Более того, материал не должен быть цитотоксичным для вновь образующейся инфекции или проявлять системную цитотоксичность (Diogo G.S. et al., 2014; Chandorkar Y. et al., 2015). Материал костного имплантата должен способствовать адгезии клеток и обеспечивать хорошую микросреду для роста клеток.

1.3.2 Механические характеристики

Учитывая, что имплантат постоянно испытывает нагрузку, он должен обладать свойствами упругой жесткости, прочности и ударной вязкости (Kumar A. et al., 2013; Dubey A.K. et al., 2013). Слишком высокая жесткость костных каркасов приводит к явлению экранирования от высокого напряжения под действием нагрузки. Отсутствие возможности распределить нагрузку с имплантата на соседнюю костную ткань, приводит к недостаточной механической стимуляции заполненной аутогенной и исходной губчатой кости. Это индуцирует абсорбцию костной ткани, приводящую к ослаблению имплантата, что, в конечном итоге, приводит к невозможности восстановления и реконструкции кости (Wang Y.E. et al., 2015). Напротив, если жесткость слишком низкая, это снижает несущую способность, делая кость более склонной к разрушению, и, следовательно, имплантат не будет соответствовать требованиям механической прочности (Qin M. et al., 2014). Кроме того, материал должен легко обрабатываться и со временем сохранять свою форму в процессах остеоинтеграции. Это означает, что костные биоматериалы должны обладать хорошей пластичностью (Kashirina A. et al., 2019).

1.3.3 Структура, пористость

Наиболее важным аспектом является структура имплантата. Количество, размер и взаимосвязанность пор на поверхности имплантата играют ключевое значение для механизмов клеточной адгезии, индукции трехмерной регенерации ткани, роста клеток, пролиферации, дифференцировки, экскреции, как клеточной, так и продуктов деградации имплантатов (Kumar A. et al., 2016).

Идеальный диаметр пор материалов каркаса должен быть аналогичен размеру нормальной костной единицы (средний размер человеческой костной единицы составляет около 223 мкм). Как правило, диаметр пор каркаса в диапазоне от 200 до 400 мкм считается адекватным (Hamlet S. et al., 2020). Чтобы поддерживать желаемую форму и механическую прочность, пористость костных каркасов должна быть как можно выше. В идеале, пористость трехмерной структуры должна составлять более 90%, чтобы успешно способствовать адгезии и росту клеток, вращанию кости в материал, транспорту питательных веществ и выделению метаболитов (Datta N. et al., 2006; Zhang N. et al., 2007).

Размер пор должен быть достаточным чтобы обеспечить клеточную миграцию, с одной стороны, и связывание клеток с скаффолдом, с другой (Yu J. et al., 2018). Деградация каркаса должна продолжаться до тех пор, пока происходит регенерация ткани (Ge Z. et al., 2008).

Таким образом, идеальный каркас для костной ткани должен обладать свойствами остеокондуктивности, биоразлагаемости и надлежащими механическими свойствами. Помимо этого, необходимо создание имплантатов неправильной формы под индивидуальные нужды пациента и иметь возможность доставки клеточной фракции в остеорепаративный очаг (Chen Q.Z. et al., 2006). Тканевая инженерия направлена на создание искусственных конструкций в виде трехмерных имплантатов, содержащих соответствующие клетки, имплантированные непосредственно *in vivo*, чтобы стимулировать и направлять образование новых тканей.

1.3.4 Металлические материалы

Металлические материалы были одним из самых ранних биологических материалов, разработанных для использования человеком. Они широко использовались в искусственных протезах и искусственных суставах. Металлические материалы характеризуются усталостной прочностью и простотой обработки, а некоторые материалы также имеют значительную ударную вязкость. Поэтому металлические материалы по-прежнему играют важную роль в регенерации костей, зубов и других частей, испытывающих большие нагрузки (Stevens M.M., 2008). В настоящее время наиболее часто используемыми металлическими материалами являются нержавеющая сталь, сплав на основе кобальта и сплав на основе титана. Основной проблемой металлических материалов является распространение ионов металла в окружающие ткани, вызванное коррозией из-за физиологической среды. Это приводит к токсичности и нежелательным побочным эффектам. Кроме того, различие между модулем Юнга кости и имплантата может вызывать так называемое «экранирование стресса», которое впоследствии препятствует передаче физиологического стресса костным тканям (Noyama Y. et al., 2013). Чтобы решить эти проблемы, исследователи используют различные модификации поверхности для улучшения биосовместимости материала.

Наиболее важной особенностью биоматериалов второго поколения является их биологически активная природа, а некоторые могут быть биоразлагаемыми *in vivo*. Они

состоят из синтетических и природных полимеров (К примеру, коллаген), фосфатов кальция, карбоната кальция, сульфатов кальция и биологически активных стекол.

1.3.5 Неметаллические неорганические материалы

Природные неорганические материалы — это в основном коралловые материалы и спеченная в печи кость каракатицы. Карбонат кальция является основным компонентом коралла, обладающим преимуществами высокой пористости и хорошей остеокондуктивности, а также широко распространен в природе. Однако к его недостаткам относят плохие механические свойства и низкую остеоиндуктивность, что ограничивает его применение в инженерии костной ткани. Спеченная в микроволновой печи кость кальмара представляет собой пористый чистый костный минеральный материал, полученный путем кальцинирования, который представляет собой нагрев материала до высоких температур. После спекания в микроволновой печи, органическое вещество может быть удалено из кости кальмара, а антигенность достигнута полной инактивацией бактерий. В то же время, высокая пористость костного минерала и трехмерная структура пор, подходящие для остеогенеза, сохраняются (Kim B.S. et al., 2014). Данный материал обладает хорошей биосовместимостью, поэтому ССК успешно адгезируются к его поверхности и пролиферируют. Кроме того, этот материал в определенной степени, способствует остеогенной дифференцировке стволовых клеток.

1.3.6 Синтетические неорганические материалы

Большинство синтетических неорганических материалов, используемых в инженерии костной ткани, представляют собой биокерамику, прошедшую высокотемпературную обработку. Среди них гидроксиапатит и трикальцийфосфат наиболее изучены. Инертная биокерамика (например, биокерамика из оксида алюминия) очень мало взаимодействует с тканями человека *in vivo* и может использоваться в искусственных суставах. Биоактивная керамика на основе фосфата кальция, может образовывать химические связи с костной тканью в физиологической среде, приводя к остеоинтеграции. Кроме того, гидроксиапатит, биоактивное стекло и биоактивная стеклокерамика, используются для покрытия поверхности протеза и в качестве искусственных материалов для костной пластики (Ma X.F., Zhang J.Y., 2014). Биоабсорбируемая / биоразлагаемая биокерамика, такая как трикальцийфосфат, может постепенно разлагаться *in vivo* и затем поглощаться костной тканью.

Кальцийфосфатный цемент является ещё одним примером биоразлагаемой керамики, которая имеет множество применений в качестве каркасного материала.

Свойства фосфатов кальция влияют на биологическую активность, такую как адгезия, пролиферация и образование новой кости остеобластами. Для проявления этих биоактивных свойств необходима биodeградация материала и высвобождение ионов в фосфатах кальция (Sun H., Yang H.L., 2015). Эти явления способствуют увеличению локальной концентрации ионов кальция и фосфора, приводя к образованию костных минералов на поверхности фосфатов кальция. Фосфаты кальция также влияют на экспрессию маркеров дифференцировки остеобластов, таких как COL1, ALP, BMPs, OPN, OCN, BSP, ON и RUNX2 (Whited B.M. et al., 2006; Orimo H., 2010; Shea J.E., Miller S.C., 2005; Frank O. et al., 2002; Komori T., 2010). Имплантаты с покрытием из кальций-фосфатов играют важную роль в адгезии клеток и формировании тканей, влияя на адсорбцию белков внеклеточного матрикса на поверхности имплантата (Fujii E. et al., 2006; Tsapikouni T.S., Missirlis Y.F., 2008). Их свойства также влияют на регенерацию кости, воздействуя на новообразованные костные минералы (Dorozhkin S.V., 2007).

Ионы кальция воздействуют на клетки и живые системы несколькими способами. Кальций, в основном, существует в форме фосфатов кальция в костных тканях и является одним из ионов, образующий костный матрикс (Peacock M., 2010). Ионы вызывают образование и созревание кости путем кальцификации. Кроме того, ионы кальция влияют на регенерацию кости, посредством клеточной передачи сигналов. Кальций стимулирует зрелые костные клетки, посредством образования оксида азота и индуцирует клетки-предшественники роста костей для регенерации костной ткани (Foreman M.A. et al., 2005; Riddle R.C. et al., 2006). Ионы кальция также стимулируют путь синтеза остеобластной кости, активируя ERK1/2 (Liu D. et al., 2008), и увеличивают продолжительность жизни остеобластов, активируя пути PI3K / Akt (Danciu T.E. et al., 2003). Кроме того, ионы кальция регулируют образование и резорбтивные функции остеокластов (Asagiri M., Takayanagi H., 2007; Kuroda Y. et al., 2008).

Ионы фосфора присутствуют в организме человека в больших количествах. Они участвуют в синтезе белков, нуклеиновых кислот и АТФ, влияя на физиологические процессы (Penido M.G., Alon U.S., 2012; Khoshniat S. et al., 2011). Более 80% ионов фосфора присутствуют в кости в форме фосфатов кальция вместе с ионами кальция. Фосфор, в основном, существует в форме фосфата $(PO_4)_3$, который оказывает большое

влияние на формирование и рост тканей (Khoshniat S. et al., 2011). Фосфаты регулируют дифференцировку и рост линии остеобластов через IGF-1 и ERK1 / 2 пути и увеличивают экспрессию BMPs (Tada H. et al., 2011; Julien M. et al., 2009). Кроме того, фосфаты имеют отрицательную обратную связь между RANKL и его рецептором, регулируя соотношение RANKL: OPG вызывает ингибирование дифференцировки остеокластов и резорбцию костной ткани (Mozar A. et al., 2008; Zhang R. et al., 2011).

Остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства фосфатов кальция важны для регенерации кости. Остеоиндукция — это способность побуждать клетки-предшественники дифференцироваться в остеобластные линии (Ambard A.J., Mueninghoff L., 2006; Samavedi S. et al., 2013), тогда как остеокондукция — это способность роста костей на поверхности материалов (Albrektsson T., Johansson C., 2001). Остеоиндукция и остеокондукция стимулируют адгезию и пролиферацию клеток. На адгезию сильно влияет способность фосфатов кальция адсорбировать белки внеклеточного матрикса, состав которого зависит от поверхностных характеристик фосфатов кальция, таких как шероховатость поверхности, кристалличность, растворимость, фазовое содержание, пористость и поверхностный потенциал (Samavedi S. et al., 2013).

Остеокондукция и остеоиндукция зависят от нескольких факторов. Некоторые исследования показали, что фосфаты кальция являются остеоиндуктивными даже в отсутствие добавок (Samavedi S. et al., 2013). Например, поверхностная химия и поверхностный заряд влияют на адсорбцию белка, а дифференцировка остеобластов происходит через взаимодействие между клетками и внеклеточным матриксом. Поверхностная морфология также может оказывать эти эффекты (Samavedi S. et al., 2013).

Роль шероховатости поверхности фосфата кальция определяется размером зерна и размером частиц кристаллической структуры фосфата кальция. Шероховатость влияет на адгезию белка на поверхности фосфата кальция. В целом, адгезия белка улучшается при шероховатости менее 100 нм (Santos E.A. et al., 2008; Webster T.J. et al., 2000). Шероховатость поверхности также влияет на адгезию клеток (Deligianni D.D. et al., 2000).

Пористость фосфата кальция влияет на биологическую активность остеобластического дифферона. Увеличение пористости улучшает контакт с

биологическими жидкостями на поверхности материала, способствуя увеличению скорости растворения фосфатов кальция, а наличие пор на поверхности влияет на адсорбцию белка. Показано, что адсорбция белка усиливается, когда размер пор фосфата кальция составляет 20–500 мкм (Rouahi M. et al., 2006; Zhu X.D. et al., 2010; Li X. et al., 2008). Этот эффект наблюдался при увеличении количества пор. Кроме того, размер пор влияет на вращение кости и ангиогенез (Sakamoto M., 2010; Mygind T. et al., 2007). При размере пор около 50 мкм или более, вращение кровеносных сосудов и костей заметно усиливалось (Saiz E. et al., 2007; Dorozhkin S.V., Erple M., 2002). Размеры пор более 100 мкм влияют на механическую прочность и форму фосфатов кальция (Sánchez-Salcedo S. et al., 2008). Из-за наличия пор, фосфат кальция проявляет такие механические свойства, как высокая хрупкость, низкая ударопрочность, повышается напряжение при растягивании (Ambard A.J., Mueninghoff L., 2006). Несмотря на это, прочность на сжатие фосфатов кальция выше, чем у натуральной кости, поэтому имплантаты на его основе могут испытывать высокие нагрузки только после остеоинтеграции.

Критическим фактором в регуляции остеогенеза является гидрофильность поверхности имплантата. Гидрофильные поверхности необходимы для адсорбции клеток и ускорения клеточных реакций фибробластов (Agonov D. et al., 2006). Кроме того, гидрофильность способствует пролиферации и дифференцировке костных клеток, влияя на клеточные реакции, приводящие к остеоинтеграции (Eriksson C. et al., 2004; Zhao G. et al., 2005). Выявлено повышение адгезивных и пролиферативных свойств остеобластов при использовании гидрофильных материалов в качестве имплантата (Lim J.Y. et al., 2004).

На процесс растворения фосфатов кальция влияют площадь поверхности на единицу объема, конвекция жидкости, кислотность и температура (Ambard A.J., Mueninghoff L., 2006). Это определяет стабильность и растворимость фосфатов кальция и, как правило, растворимость обратно пропорциональна отношению ионов Ca/P, чистоте, размеру кристаллов и площади поверхности. Стабильные фосфаты кальция с низкой растворимостью демонстрируют низкий ионный обмен с окружающей средой и низкую скорость рекристаллизации на поверхности, что стабилизирует концентрацию и конформацию белков на поверхности. С другой стороны, фосфаты кальция с высокой растворимостью легко изменяют местный pH и концентрацию ионов, так что это влияет

на адгезию белков. Белковая адгезия вызывает клеточную адгезию и определяет эффективность регенерации кости (Gustavsson J. et al., 2012; Hu Q. et al., 2007; Bodhak S. et al., 2009).

Таким образом, инженерия костной ткани - быстро развивающаяся отрасль, в которой исследователи сосредоточены на разработке и совершенствовании новых материалов, максимально достоверно имитирующих биологическую среду организма (Shih Y.R.V. et al., 2014). Поскольку кости обладают высокой механической прочностью благодаря минеральным компонентам, композитная конструкция из полимера с НАр и трикальцийфосфатом создает естественную среду для адгезии клеток, остеогенной дифференцировки и формирования тканей. Композитные материалы играют важную роль в регенеративных процессах тканей. Достигнуто большое количество многообещающих результатов *in vitro*, но, к сожалению, только некоторые из них были успешными *in vivo* (Stefanic M. et al., 2012). Значительное улучшение структурных характеристик скаффолдов было достигнуто благодаря внедрению 3D-печати и ее применению в биологических системах (Shih Y.R.V. et al., 2014). В настоящее время разрабатывают биоматериалы для инъекционных применений, чтобы избежать инвазивной хирургии и разработать методы для создания нановолокнистых каркасов (Combes C., Rey C., 2010).

Резюме по разделу

За последнее десятилетие было проведено множество исследований, касающихся участия ССК в регенерации костной ткани. Помимо регенерации и восстановления костей, ССК могут быть использованы для таргетных терапий, в качестве носителей определенных факторов (биомолекул, наноконструкций) или генов (Shao J. et al., 2015). В настоящее время ССК не являются повседневным терапевтическим вариантом для применения при широком спектре патологий, но их использование считают многообещающей перспективой.

Клеточно-молекулярные реакции ССК на различные воздействия и их взаимодействие с различными субстратами не до конца изучено. Особенно это касается факторов изменения дифференцировочной картины или регуляции клеточного цикла, ведь применение неправильно детерминированных клеток может сказываться негативно на микроокружении и на самих стволовых клетках.

Существует значительная потребность исследования точных закономерностей участия ССК в процессах заживления кости и в оценке их эффективности при крупных дефектах кости, задержке/несращении переломов и нарушении регенерации костной ткани. С другой стороны, нарушения пролиферации и дифференцировки ССК могут приводить к онкогенезу или их коммитированию в нежелательные взрослые клетки (например, дифференцировка ССК в остеобласты в миокарде или стенке кровеносных сосудов).

Становится очевидным, что выявление тонких молекулярно-клеточных механизмов влияния (эпи)генетических и ростовых факторов микроокружения на ССК является актуальной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

2.1.1 Биологический материал для исследования

Материалом для исследования служили стромальные стволовые клетки (ССК), выделенные из липоаспирата подкожной жировой ткани человека (Разрешение локально-этического комитета БФУ им. И. Канта: Протокол №1 от 28.02.2019). Экспериментальные исследования проведены на базе Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта (директор центра – д-р мед. наук Л.С. Литвинова).

Критериями исключения материала из исследования являлись: возраст моложе 18 и старше 35 лет; инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости.

2.1.2 Титановые образцы с кальцийфосфатным покрытием

В качестве подложки использовали коммерчески чистый титан (Ti, состав в массовых %: 99.58Ti, 0.12O, 0.18Fe, 0.07C, 0.04N и 0.01H) с двусторонним нанесением покрытия из фосфатов кальция; общий размер образцов $10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$ (стороны квадрата; толщина).

КФ покрытие сформировано на Ti подложках с помощью установки Microarc-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г.Томск) методом микродугового оксидирования в анодном режиме (Legostaeva E.V. et al., 2013). В состав электролита входили: водный раствор ортофосфорной кислоты, карбонат кальция и синтетический гидроксипатит (ГАП) в следующих концентрациях: 20/9/6 массовых %. Используемый порошок ГАП получали механохимическим способом в планетарной мельнице по методике, описанной М.В. Чайкиной и др. [Chaikina M.V. et al., 2008]. Под контролем электронного микроскопа JEM-200CX (Япония) диаметр наночастиц ГАП составил 10-30 нм с включением отдельных агрегатов диаметром до 100 нм. Кроме нанесения покрытия на титановые подложки, порошок ГАП использовался в системе клеточного анализа в реальном времени (RTCA) для определения его влияния на инвазию ССК.

Средний индекс шероховатости поверхности (Ra) Ti образцов с кальцийфосфатным (КФ) покрытием (TiКФ) измерен в соответствии с ГОСТ 2789-73 на профилометре Talysurf 5–120 (Taylor Hobson Ltd., Великобритания).

Морфология поверхности титановых подложек с КФ покрытием изучена при помощи оптической (инвертированный металлографический микроскоп Olympus GX-71, Olympus Corporation, Japan) и сканирующей электронной микроскопии (Philips SEM 515, Нидерланды) в Томском материаловедческом центре коллективного пользования. Микрорельеф КФ поверхностей с индексом шероховатости Ra=2-5 мкм представлен схожими нерегулярными элементами: сферолитами (10-20 мкм в диаметре) и сообщающимися углублениями между ними, пронизанными открытыми сообщающимися порами с диаметром 1-10 мкм (рис. 1). Топография искусственной КФ поверхности близка к таковой в минеральной части костной ткани при ее ремоделировании.

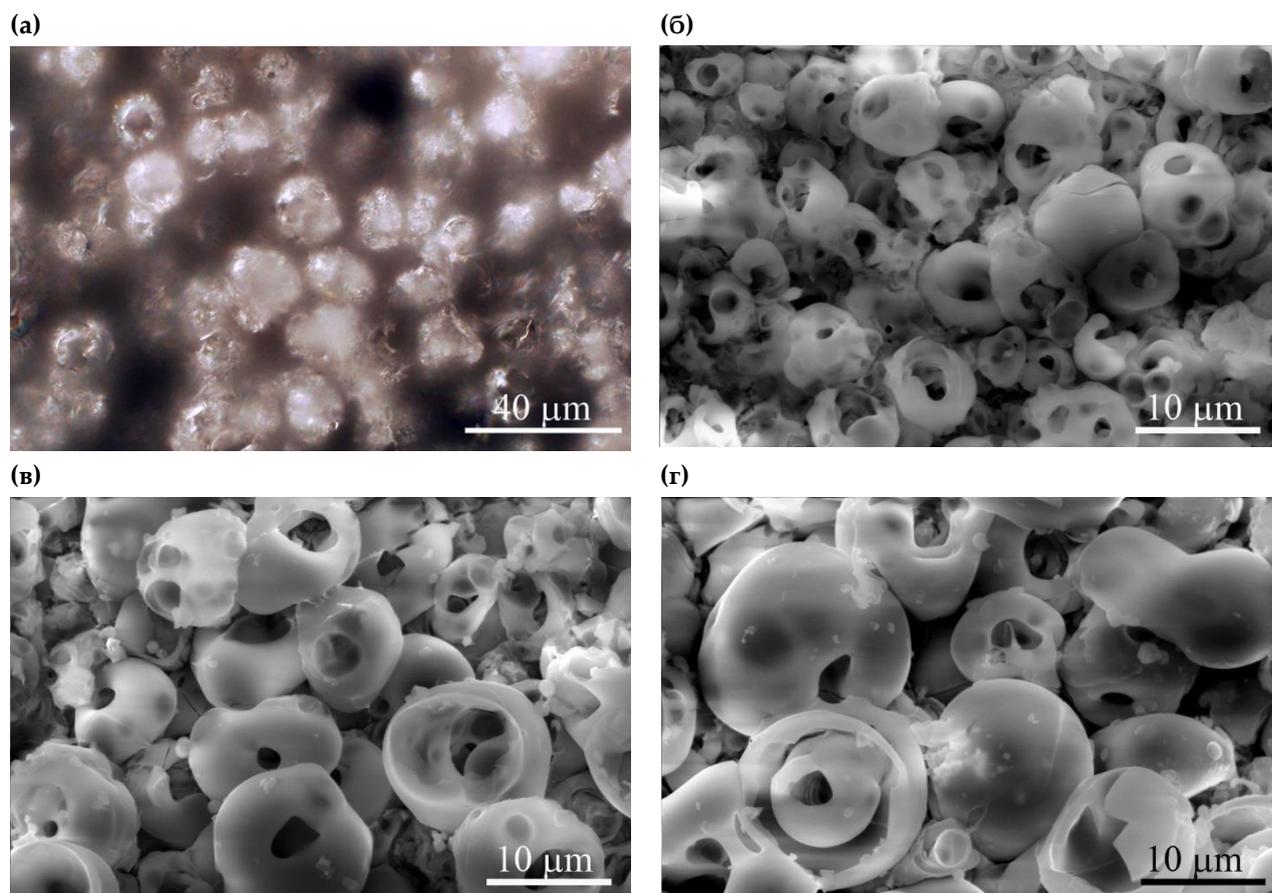


Рисунок 1. Оптическое (а) и электронно-микроскопические (б-г) изображения типичной топографии микродугового шероховатого кальцийфосфатного покрытия на титановой подложке. (а)

микроскопия в отраженном свете (темное поле); (б) Ra = 2,0-2,9 мкм; (в) Ra = 3,0-3,9 мкм; (г) Ra = 4,0-4,9 мкм. Шкала 10 и 40 мкм. Увеличение, $\times 1000$ (а) и $\times 2500$ (б-г).

Рентгеноаморфность КФ-покрытия на титановой подложке была показана с использованием метода рентгеноструктурного анализа на порошковом дифрактометре ДРОН-7 (Буревестник, Россия) при длине волны источника излучения 0,17902 нанометра и угле $2\theta = 5\text{—}90$ град. Пики дифрактограмм, согласно базе данных Международного центра дифракционных данных (International Center for Diffraction Data), соответствовали фазам монетита (CaHPO_4) и бета-кальций-пирофосфата ($\text{b-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Дифрактограммы нанопорошка соответствовали фазе ГАП с небольшим пиком монетита (при 30,1883 град.) как исходного компонента при получении синтетического ГАП механохимическим методом.

Нанопорошок ГАП и изготовленные TiКФ образцы перед *in vitro* исследованиями подвергались стерилизации в сухожаровом шкафу (Sanyo, Япония) при 160 °C в течении 1 часа.

TiКФ образцы помещались в лунки культуральных планшетов в двух вариантах:

- вертикально вдоль бортика лунки (пп.2.2);
- горизонтально на дно лунки (пп.2.2).

2.2. Методы исследования

Для достижения поставленных задач исследования был разработан алгоритм оценки морфофункциональных реакций ССК в условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани.

Дизайн исследования схематично представлен на рис.2.

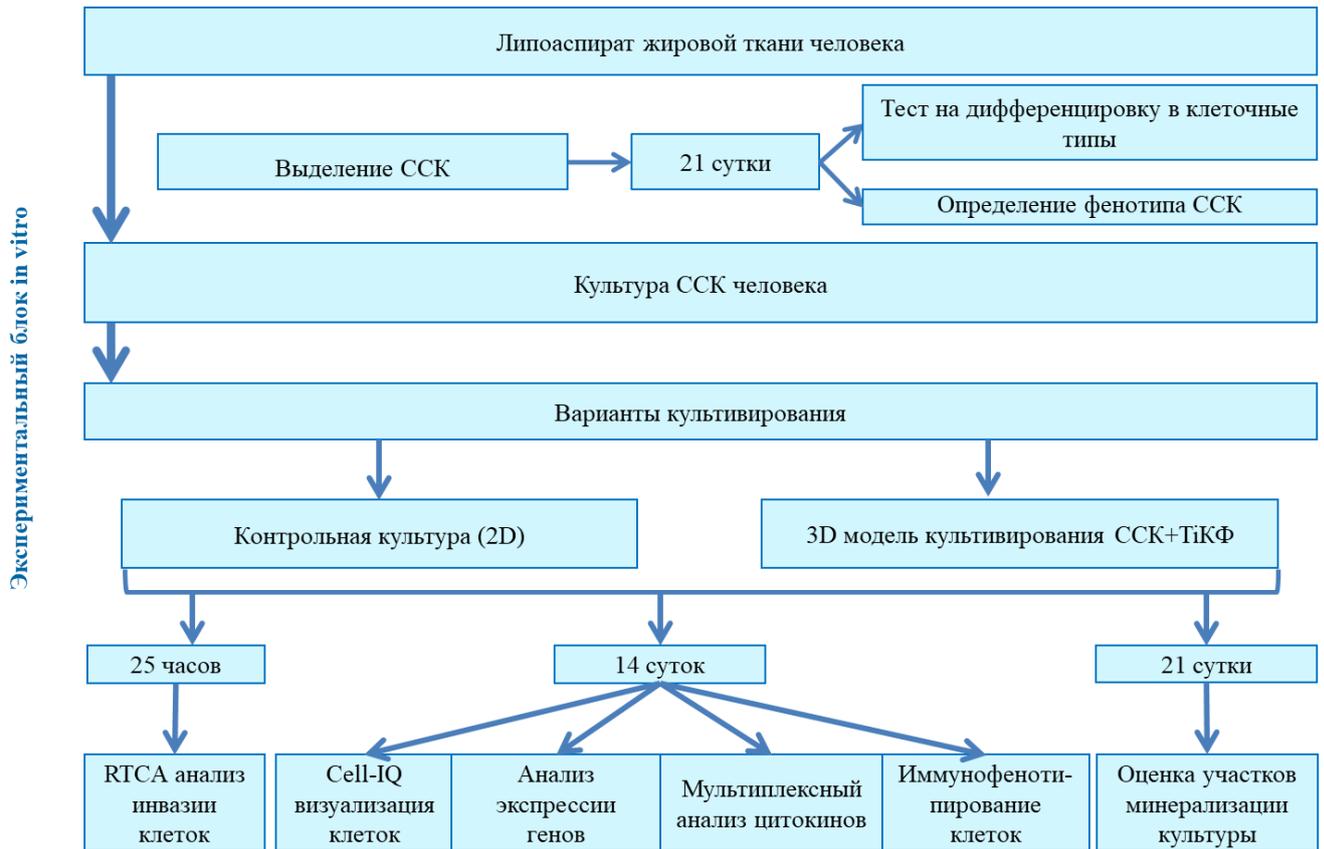


Рисунок 2. Блок-схема дизайна эксперимента.

2.2.1 Выделение культуры стромальных стволовых клеток из липоасpirата

ССК получали из липоасpirата подкожной жировой ткани условно здоровых мужчин-добровольцев в полном соответствии с юридическими и этическими принципами проведения медико-биологических исследований с использованием биоматериала человека, принятых на территории РФ, протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999 г.) а также в соответствии с Хельсинской декларацией ВМА (2000 г.) и при полном соблюдении норм конфиденциальности и обязательным информированием пациентов.

Стромально-васкулярную фракцию (СВФ) с небольшой примесью эндотелиальных клеток, перицитов и гладкомышечных клеток получали, как описано ранее (Zuk P.A. et al., 2001). Первоначально выделенную ткань гомогенизировали механическим методом в небольшом количестве среды DMEM/F12(1:1) (Gibco Life Technologies, США), после чего ферментировали раствором коллагеназы 1 типа (Sigma-Aldrich, США) в течении 60 мин при 37 °С в термошейкере со скоростью вращения 600 об/мин (0,4g). После ферментативной обработки СВФ несколько раз отмывали с помощью фосфатно-солевого буфера (PBS, Sigma-Aldrich, США). Клеточную взвесь

ресуспендировали и вливали в культуральный флакон, культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США). Содержание эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Sigma-Aldrich, США) составляло 10%, L-глутамин (Sigma-Aldrich, США) - 280 мг/л, гентамицин (Invitrogen, Великобритания) - 50 мг/л.

СВФ пересеивали до достижения конfluence 4 раза (каждый пассаж длился 5-7 дней) для увеличения популяции ССК. Питательную среду заменяли свежей порцией каждые 3-4 дня. В экспериментах использовали адгезирующие к пластику клетки после 5 пассажей. Для открепления адгезированных клеточных культур от пластика флаконы с культурой промыли 4 раза по 4 мл раствором PBS. После промывки монослой клеток ферментировали 3 мл 0,05% раствора трипсина (Sigma-Aldrich, США) в 0,53 мМ этилендиоксидтетрауксусной кислоты (ЭДТА, Sigma-Aldrich, США) и инкубировали 4 мин при 37°C. Затем промывали флаконы раствором Хенкса, содержащего 20% ЭТС, собирали клеточную взвесь в микроцентрифужную пробирку, отмывали дважды центрифугированием с PBS в течении 5 мин при 1200 об/мин (300g.). После повторного центрифугирования аккуратно удаляли надосадок и доводили клеточную взвесь в осадке до 1 мл питательной средой.

2.2.2 Определение общего числа и жизнеспособности стромальных стволовых клеток

Оценка количества и определение жизнеспособности клеток до и после культивирования производилась в культурах ССК с использованием автоматического счётчика клеток Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, США) на слайдах с добавлением 0,4% раствора красителя трипанового синего (Invitrogen, США) в 0,9 % NaCl.

В исследование отбирались клеточные культуры с жизнеспособностью не менее 90%. Клетки в неадгезированном состоянии имели сферическую морфологию и фильтровались по размеру.

2.2.3 Метод определения цитотоксичности образцов

Оценка уровня цитотоксичности ТiКФ образцов проводилась в соответствии с рекомендациями ГОСТ 10993-5-2011. ССК помещались в среду DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США) с ТiКФ образцами на протяжении 14 суток при 37 °С, 5% CO₂. Содержание ЭТС (Sigma-Aldrich, США) составляло 10%, L-глутамин (Sigma-Aldrich, США) - 280 мг/л, гентамицин (Invitrogen, Великобритания) - 50 мг/л. Замена

питательных сред производилась каждые 3-4 дня. По прошествии срока культивирования клеточные культуры откреплялись от пластика раствором трипсина (как описано в разделе 2.2.1) и определялась общая клеточность и жизнеспособность клеточных культур (по методике, описанной в разделе 2.2.2).

2.2.4 Оценка дифференцировочного потенциала выделенного пула клеток

Дифференцировочный потенциал клеток после 5 пассажей определяли путем индукции полученной культуры клеток в адипогенном, хондрогенном или остеогенном направлении с использованием набора StemPro[®] Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Питательную среду заменяли свежей каждые 3-4 дня. Культивирование проводили, соблюдая условия стерильности в 12-луночных планшетах с плоским дном (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Бельгия) при 37° С и 5% CO₂.

Для детекции прохождения дифференцировки в хондрогенном направлении использовался краситель альциановый синий (Sigma-Aldrich, США), избирательно окрашивающий протеогликаны, синтезированные хондроцитами. По окрашенным таким методом протеогликанам можно судить об успешном прохождении хондродифференцировки. Раствор ализарина красного применялся для оценки минерализации межклеточного вещества за счет образования клетками нерастворимых солей кальция, прежде всего, фосфатов кальция. Для детекции адипогенеза использовался раствор красителя масляный красный (Sigma-Aldrich, США) в целях внутриклеточной окраски липидов и нейтральных триглицеридов. Окраску производили в соответствии с протоколом производителя (Sigma-Aldrich: URL: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/ru/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/primary-cell-culture/mesenchymal-stem-cell-differentiation>). Степень окрашивания визуально оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy, США).

2.2.5 Определение иммунофенотипа стромальных стволовых клеток методом проточной цитометрии

Принцип метода: Клеточную суспензию метят флуоресцентными красителями, после чего вместе с потоком жидкости пропускают через проточную ячейку, где благодаря гидродинамическому фокусированию клетки выстраиваются в токе жидкости друг за другом. Далее отдельные клетки облучаются лазером, а сигналы рассеивания/свечения регистрируются на оптических детекторах.

Фенотипирование клеток проводили с использованием набора MSC Phenotyping Kit human (Miltenyi Biotec, Германия). В состав набора входят 2 коктейля: первый (1) содержит меченый изотип-контроль, необходимый для доказательства отсутствия неспецифического связывания антител; второй (2) - антитела, характерные для ССК (CD 73, CD 90, CD 105) и гемопоэтических клеток (CD 14, CD 20, CD 34, CD 45).

Перед фенотипированием клеток после инкубации, культуру ССК снимали с подложки (пластика) - ферментированием 0,05% трипсином (Sigma-Aldrich, США) в 0.53 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich, США), с последующей двукратной промывкой в PBS.

После окраски моноклональными антителами пробы инкубировались в течении 10 мин при 4⁰С и отсутствии света с последующей промывкой PBS. Анализ клеточных суспензий проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия).

Область интереса гейтировали на графике FSC/SSC. Для каждой пробы было обработано более 10 тыс. событий в области интереса. Для графика изотип-контроля накладывали данные изменения уровня флуоресценции различных каналов в зависимости от количества событий (Рис 3).

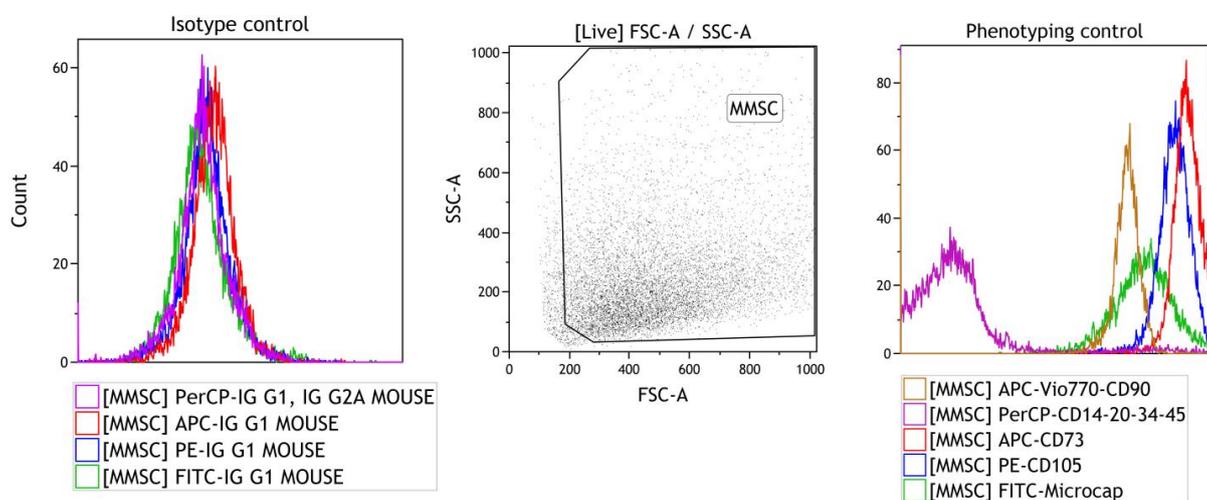


Рисунок 3. Стратегия гейтирования клеток. Распределение MMSC, полученное в результате анализа коктейля моноклональных антител – MSC Phenotyping Kit, human и CD-90. 1) Анализ распределения клеток по боковому (SSC) и прямому (FSC) светорассеянию; 2) Изотип контроль анализ проведен с использованием гейтирования по MMSC. Гистограммы распределения MMSC, полученные с использованием Isotype Control Cocktail, human; 3) Анализ проведен с использованием гейтирования по MMSC. Гистограммы распределения MMSC, полученные с использованием MSC Phenotyping Cocktail, human и CD90-APC-Vio770. Результаты, получаемые на

проточном цитометре, анализировали с использованием программного обеспечения KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

2.2.6 Анализ принадлежности выделенного пула клеток к ССК

В связи с высокой гетерогенностью первичных клеточных культур, получаемых из человеческого организма, была проведена дифференцировочная и фенотипическая идентификации принадлежности выделенного пула клеток к ССК согласно рекомендациям интернационального сообщества по клеточной терапии (ISCT) и интернациональной федерации жировой терапии и науки (IFATS) (Bourin P. et al., 2013; Dominici M. et al., 2006).

Для определения и доказательства принадлежности культуры клеток к пулу ССК используют совокупность следующих параметров:

- 1) жизнеспособность клеток должна составлять не менее 90%;
- 2) способность клеток дифференцироваться в три основных направления: хондроцитарное, адипоцитарное и остеоцитарное;
- 3) способность клеток к адгезии на пластике;
- 4) экспрессия на поверхности более 95 % клеток совокупности поверхностных рецепторов, свойственных ССК (CD73, CD90, CD105) и отсутствие экспрессии маркеров, характерных для гемопоэтических клеток (CD45, CD34, CD20, CD14).

По результатам определения числа мертвых/живых клеток в культурах ССК, проведенного с помощью автоматического счётчика клеток (Countess™ Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с использованием красителя Trypan blue 0,4% («Invitrogen», США), жизнеспособность клеток составила 97%.

С использованием метода проточной цитофлуориметрии, согласно выбранному алгоритму гейтирования (рис. 3) подтверждена принадлежность клеток к пулу ССК. В частности, с использованием набора MSC Phenotyping Kit human (Miltenyi Biotec, Германия) установлено, что более 98 % адгезивных клеток в совокупности экспрессировали маркеры CD73 (99,46%), CD90 (98,95%) и CD105 (98,6%) при почти отсутствующей (0,22%) экспрессии гемопоэтических маркеров CD45, CD34, CD20 и CD14.

По результатам 21-суточного культивирования в специализированных дифференцировочных средах StemPro® Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific, США) клетки демонстрировали позитивную окраску на ализариновый красный

(остеобласты), ализариновый синий (хондробласты) и масляный красный (адипоциты) (рис. 4). Интенсивность окраски сравнивали с интактной культурой при культивировании с использованием стандартной питательной среды (αMEM, 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина, 0.3 мг/мл L-глутамина; Sigma-Aldrich, США) без дифференцировочных добавок.

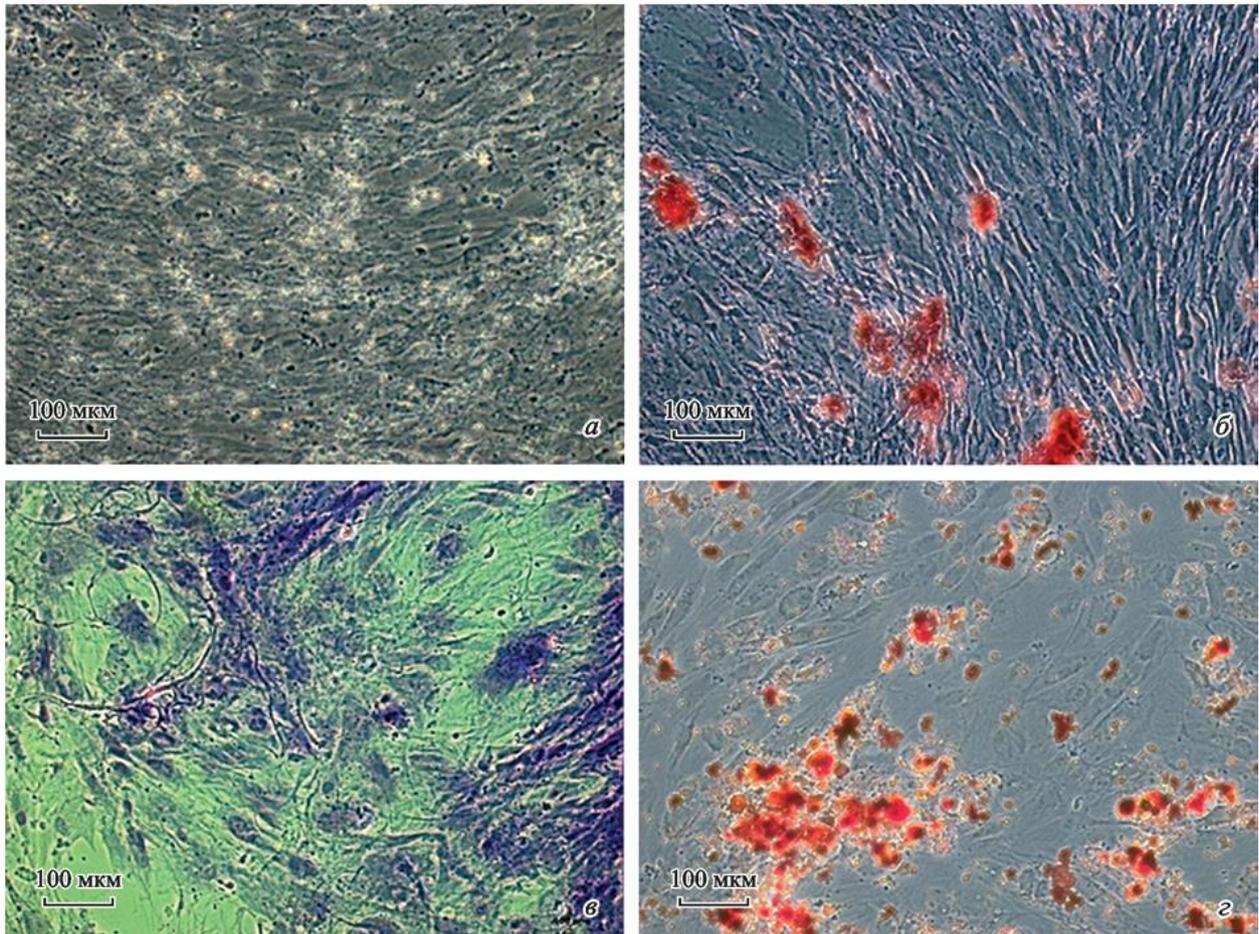


Рисунок 4. ССК жировой ткани человека через 21 сут культивирования в стандартной (а) и в дифференцировочной (б—г) средах. а—в стандартной среде без дифференцировочных добавок, некоторые клетки содержат светлые жировые включения (неокрашенный препарат); б— в остеогенной среде (ализариновым красным окрашены участки минерализации межклеточного вещества); в—в хондрогенной среде (ализариновым синим окрашены гликопротеины); г — в адипогенной среде (масляным красным окрашены участки нейтральных триглицеридов и липидов). Масштабные отрезки — 100 мкм. Об. 40.

С использованием методов фазово-контрастной микроскопии была показана способность клеточной культуры к адгезии на пластике (Рис. 4а).

На основе вышеизложенного можно сделать вывод о том, что используемые в эксперименте клетки после 5-го пассажа соответствовали всем критериям, предъявляемых к СКК человека.

2.2.7 Оценка способности стромальных стволовых клеток к миграции с использованием Cell-IQ системы непрерывного наблюдения

Морфологию СКК, их подвижность, способность образовывать монослой оценивали в системе непрерывного наблюдения в реальном времени за живыми культурами Cell-IQ® v2 MLF (CM Technologies, Финляндия). Данная система позволяет при помощи методов фазово-контрастной микроскопии оценивать вышеуказанные параметры на протяжении всего эксперимента. В эксперименте оценивались направления миграции клеток, относительно внесенных в лунку 12-ти луночного планшета образцов с КФ-покрытием на титановой Ti подложке (TiКФ).

Для эксперимента использовали стерильные 12 луночные плоскодонные планшеты для адгезивных культур (Orange Scientific, Бельгия; площадь лунки 3.47 см²). TiКФ образцы крепились в вертикальном положении на один из краев лунки планшета и закреплялись клипсами для обеспечения неподвижности образца во время движения предметного столика прибора и смены питательных сред. Образцы находились в среде наполовину, что обеспечивало возможность доступа клеток к ¼ площади образца. Клетки адгезировали к пластику в капле объемом 70 мкл по центру лунки в течении 120 мин в условиях CO₂ инкубатора. Использовались жизнеспособные кариоциты после 5-го пассажа в количестве 5×10⁴ клеток на лунку. Для жизнеобеспечения культуры использовали 1,5 мл среды DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США) с добавлением 10% ЭТС (Sigma-Aldrich, США), 50 мг/л гентамицина (Invitrogen, Великобритания) и 280 мг/л L-глутамина (Sigma-Aldrich, США). Таким образом, изучалась миграция СКК в среде, содержащей продукты биodeградации TiКФ образцов. Контрольными образцами выступили клетки, культивировавшиеся в лунках без добавления 3D матриксов.

В системе визуализации выбирали по 2 точки на каждую лунку, за которыми велось наблюдение. Точки выбирались равноудаленно от центра лунки с каплей адгезированной культуры и TiКФ образца (рис. 5).

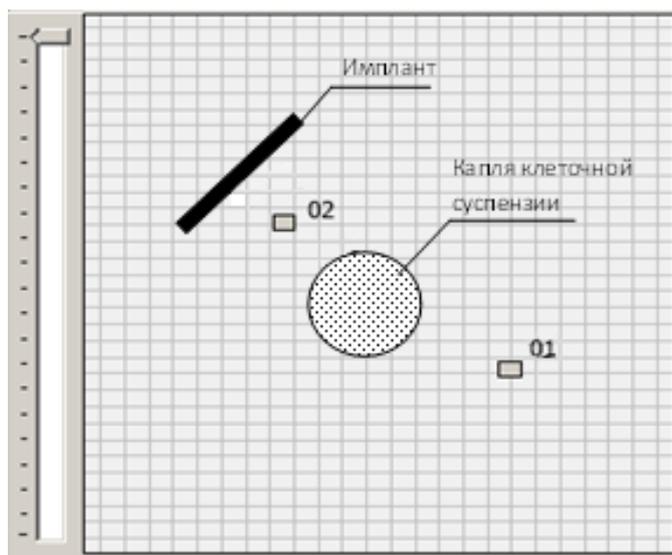


Рисунок 5. Схема расположения точек визуализации миграции клеток по отношению к первичной клеточной суспензии и образцам с кальцийфосфатным покрытием.

Шаг получения изображений составлял 45 минут. Это позволило создать библиотеку, включающую 1308 снимков для каждой точки, однако для дальнейшего автоматического анализа с помощью встроенного софта было использовано каждое десятое изображение. Этого было достаточно для статистической обработки полученных данных. На каждом снимке каждой точки определялось количество клеток и время начала первого деления. Для распознавания ССК в автоматическом режиме были созданы библиотеки цифровых изображений клеток в разных фазах клеточного цикла и дебриса.

При ручной обработке видеофильмов определяли линейную скорость свободного движения клеток до их вступления в межклеточные контакты. Расстояние, пройденное клеткой, оценивали по перемещению ядра в связи с вариабельностью формы и различных размеров (до 150 мкм) мигрирующих ССК. При сравнении с автоматическим подсчетом ошибка составляла не более 5 клеток на 1 точку визуализации.

По прошествии 14 суток планшеты с клетками снимались с системы Cell- IQ и переносились в CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония) при 37 °С, влажности 100 % в атмосфере 5 % CO₂ для последующей оценки влияния трехмерного культивирования на дифференцировку ССК. Культура клеток содержалась в среде DMEM/F12 (1:1), полный состав которой указан выше, при смене среды каждые 3-4 суток. На 21 сутки ССК ферментировали 0,05% трипсином (Sigma-Aldrich, США) в 0.53 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich, США) и дважды отмывали PBS.

TiКФ образцы удалялись, адгезированные клетки фиксировались 10% формалином в течении 1 ч. Далее культура отмывалась PBS и окрашивалась водным раствором красителя ализарин красный (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 2% для определения минерализации (кальцификации) межклеточного матрикса и оценки остеодифференцировки. Оценку проводили с помощью методов фазово-контрастной микроскопии на приборе ZEISS Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy, США) с использованием программного обеспечения ZEN 2012 (Carl Zeiss Microscopy, США).

2.2.8 Оценка *in vitro* растворимости образцов, концентраций ионов в их экстрактах и супернатантах клеточной культуры

В соответствии с ГОСТ ISO 10993-9-2011, необходимость проведения исследования биodeградации обусловлена способностью КФ покрытий рассасываться в биологической среде. Для тестирования биodeградации применяли TiКФ образцы с линейными размерами (стороной квадрата) 10-11 мм и толщиной не более 1 мм. В каждой группе исследования было по 3 образца, в экстрактах каждого из которых проводили в дальнейшем по 3 измерения концентрации ионов. В качестве контроля сравнения применяли модельную биологическую жидкость (питательная среда RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), Sigma-Aldrich, США) без добавления TiКФ образцов. Выбор питательной среды обусловлен минимальным содержанием солей кальция (0,1 г/л), которые могут влиять на высвобождение минералов из КФ покрытия на титановых подложках.

TiКФ образцы помещали в индивидуальные, стерильные, химически инертные, пластиковые контейнеры на 50 мл с крышкой (FL Medical, Италия), содержащие растворитель (среда RPMI-1640) в объеме 2 мл и термостатировали при 37°C. Объем используемого растворителя (2 мл) определяли, исходя из суммарной площади поверхности образцов (2-2,5 см²), согласно рекомендациям ГОСТ ISO 10993-12-2011 (диапазон 1,25-3 см²/мл растворителя). Данного объема достаточно для проведения сравнительных исследований продуктов биodeградации в экстрактах TiКФ образцов при измерениях ион-селективными электродами.

В конце 1 и 2-й недель термостатирования растворы полностью забирали из контейнеров и заменяли свежей порцией растворителя (после 1-й недели растворения). Забранные экстракты помещали в стерильные пластиковые микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф (объем 2 мл) и хранили при -20 °C до тестирования.

Оценку продуктов деградации проводили в соответствии с рекомендациями по ГОСТ ISO 10993-9. Измеряли: изменения массы TiКФ образцов в результате их биodeградации; концентрации продуктов деградации с помощью метода ионо-селективных электродов.

Взвешивание образцов до и после растворения осуществляли на электронных микроаналитических весах GR-202 (AND, Япония) с точностью определения массы до 5-го знака после запятой (среднеквадратичное отклонение при взвешивании 0,023-0,047 мг). После растворения перед взвешиванием TiКФ образцы сушили при 100 °С в течение 1 ч в шкафе сушильном ШС-80 (ОАО “Гродненский завод торгового машиностроения”, Беларусь)

Количественную оценку концентраций кальция (общей фракции и свободного), и неорганического фосфора (фосфатного иона PO_4^{3-}) в экстрактах TiКФ образцов и супернатантах 6-дневной культуры СКК человека выполняли с погрешностью 1-2% согласно инструкции фирмы-производителя (Thermo Fisher Scientific Inc., США) на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab60i (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с встроенными ионо-селективными электродами. Результаты выражали в миллимолях (мМ). Получение супернатантов клеточных культур описано в п. 2.2.10.

2.2.9 Анализ экспрессии генов

Для оценки экспрессии генов остеодифференцировки (RUNX2, BMP2, BMP6, BGP, ALP) в СКК из полученных образцов выделяли РНК с использованием реагента Extract RNA kit (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Затем проводили реакцию обратной транскрипции выделенной РНК с использованием праймера oligo(dT)23-primer (20 мкМ) (Beagle, Россия) и обратной транскриптазы MMLV (Евроген, Россия).

Мультиплексный ПЦР анализ проводили в трех повторах с использованием реагентов qPCRmixHS (Евроген, Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров (Beagle, Россия) в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве матрицы использовались 4 мкл кДНК. В качестве референсного гена использовали ген RPLPO.

Результаты ПЦР анализировали с помощью метода максимума второй производной. Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов

производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации.

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

Используемый относительный количественный анализ основан на отношении экспрессий исследуемого к экспрессии референсного гена и является достаточным для большинства целей при исследовании физиологических изменений в уровнях экспрессии генов.

Использовали олигонуклеотидные праймеры (Beagle, Россия), представленные в табл.1.

Таблица 1

Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте

Название гена	Последовательность	Длина, п.н.
RPLPO	F: 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAАСТ-3'	20
	R: 5'-CCATCAGCACCCACAGCCTTC-3'	20
	Bgl635-5'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'-BHQ-2	25
hTERT	F: 5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3'	20
	R: 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'	21
	Probe: FAM-5'-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3' -BHQ-1	24
Homo sapiens runt-related transcription factor 2 (RUNX2)	F:5'- CCAGAAGGCACAGACAGAAG-3'	20
	R: 5'- GATGAGGAATGCGCCCTAAA-3'	20
	Probe: 5'- FAM-AGTTTGTCTCTGACCGCCTCAGT--BHQ1-3'	24
Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2)	F:5'-ACGAGGTCCTGAGCGAGTT-3'	19
	R: 5'-GACCTGAGTGCCTGCGATAC-3'	20
	Probe: 5'- FAM-CTGAAACAGAGACCCACCCCAAGCA-BHQ1-3'	25
Homo sapiens bone morphogenetic protein 6 (BMP6)	F:5'- TTACAGGAGCATCAGCACAG-3'	20
	R: 5'- GGAGTCACAACCCACAGATT-3'	20
	Probe: 5'- FAM- CCTCAGAAGAAGGCTGGCTGGAAT-BHQ1 -3'	24
Homo sapiens bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (BGLAP) или osteocalcin (BGP)	F: 5'- GAGGGTATAAACAGTGCTGGAG-3'	22
	R: 5'- AATAGGGCGAGGAGTGTGA-3'	19
	Probe: 5'-FAM-CAGCCACCGAGACACCATGAGA-BHQ1-3'	22
Homo sapiens alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL)	F:5'-GGGAAATCTGTGGGCATTGT-3'	20
	R: 5'-GAGTACCAGTCCCGGTCAGC-3'	20
	Probe: 5'- FAM-ACCACGAGAGTGAACCATGCCA-BHQ1-3'	22
Homo sapiens TATA box binding protein (TBP)	F: 5' - TCTTGGCGTGTGAAGATAACC-3'	21
	R: 5' - GCTGGAACTCGTCTCACTATTC-3'	22
	Probe: 5'- FAM-AGTTGCTGAGAAGAGTGTGCTGGA-BHQ1 -3'	24
Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)	F: 5' - TGGCGTCGTGATTAGTGATG-3'	20
	R: 5' - GACGTTCACTCCTGTCCATAAT-3'	22
	Probe: 5'- FAM-TGCTGAGGATTTGGAAAGGGTGTG-BHQ1-3'	24
Homo sapiens ubiquitin C (UBC)	F: 5' - CATAAGACTCGGCCTTAGAACC-3'	22
	R: 5' - GTTCCGCTCTCTGGAAAGAA -3'	20

	Probe: 5'-FAM- TTAGGACGGGACTTGGGTGACTCT - BHQ1-3'	24
Homo sapiens fibroblast growth factor 10 (FGF10)	F: 5'- GATTGAGAAGAACGGGAAGGT-3'	21
	R: 5'- GCTTTGACGGCAACAACCTC -3'	19
	Probe: 5'- FAM-CAGCGGGACCAAGAAGGAGAAGCTG-BHQ1-3'	24
Homo sapiens T-box 5 (TBX5)	F: 5'- ATCATAACCAAGGCTGGAAGG-3'	21
	R: 5'- CAGGTACAATGTCCATGAGAAGA-3'	23
	Probe: 5'- FAM-AGTTACAAAGTGAAGGTGACGGGC-BHQ1-3'	24
Homo sapiens SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 (SMURF1)	F: 5'- CCACCCATATATCCCTCCTTTAC-3'	23
	R: 5'-CTGTGTGACCAAAGCCAAAG-3'	20
	Probe: 5'-FAM-ACCCACTTCCATACCCATCCAAT-BHQ1-3'	24

2.2.10 Количественное определение факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов методом проточной флуориметрии

Принцип метода: специфичные антитела, направленные против биомаркера ковалентно связаны с микросферами, реагирующими с образцом, содержащим интересующий биомаркер. После серии промываний для удаления несвязанного белка добавляется биотинилированное детектирующее антитело для создания сэндвич-комплекса. Окончательный комплекс детектирования образуется при добавлении конъюгата стрептавидин-фикоэритрина. Фикоэритрин служит флуоресцентным индикатором.

Супернатанты 14-дневных культур клеток центрифугировали 10 мин при 500g. Хемокины, ростовые факторы, а также про- и противовоспалительные цитокины (IL-1 α , IL-2 α , IL-3, IL-12p40, IL-16, IL-18, CTACK, GRO α , HGF, IFN α 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, b-NGF, SCF, SCGF-b, SDF-1 α , TRAIL) были количественно определены методом проточной флуориметрии с использованием автоматизированной системы анализа белков (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) и коммерческой тест-системы (Bio-Plex Pro Human cytokine Group II 21-Plex Panel, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) в соответствии с протоколом производителя. В планшет добавлялось 50 мкл суспензии магнитных микросфер с последующей промывкой на промывочной станции (Bio-PlexPro™ WashStations, Bio-Rad, США) с магнитным планшетодержателем. Супернатанты 14-дневных культур клеток центрифугировали 10 мин при 500g и вносили в планшет с стандартами и контрольными образцами. Планшет инкубировался в течении 30 мин в термошейкере при комнатной температуре при 850 об/мин (0,4 g) в темноте, после чего трехкратно промывался 100 мкл промывочного буфера. После отмывки в лунки планшета вносили 25 мкл детектирующих антител и инкубировали в аналогичных условиях. После трехкратной промывки добавляли 50 мкл конъюгата

стрептавидин-фикоэритрина и инкубировали 10 минут с последующей трехкратной промывкой. Далее образцы ресуспендировались в буфере для проб (Assay buffer) и анализировались на автоматизированной системы анализа белков (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием программного обеспечения (Bio-Plex Manager, Bio-Rad, США).

2.2.11 Определение способности стромальных стволовых клеток формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру с помощью образцов с КФ-покрытием на титановой подложке

Прямое культивирование ССК жировой ткани здорового добровольца (5×10^4 клеток/лунку) на Ti пластинах с КФ покрытием (3D-матриксах) проводили в 12-луночных планшетах (Orange Scientific, Бельгия) в полной питательной среде (ППС). 3D-матрикс занимал только часть общей площади поверхности лунки. ППС для культивирования состояла из α -MEM (Sigma-Aldrich, США), 10% инактивированной (56°C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ L-глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 Е/мкг/мл пенициллин/стрептамицин (Gibco Life Technologies, США). Часть культур культивировали в остеогенной дифференцировочной среде StemPro® Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

После 24-ч адгезии клеток 3D-матрикса с клетками, засеянными на их поверхность, переносили в чистые лунки с бесклеточной ППС и культивировали 21 день при 37°C , во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Негативным контролем служила культура ССК (5×10^4 клеток/лунку) в ППС без 3D-матрикса. Позитивным контролем остеогенной дифференцировки считали двумерную культуру ССК в остеогенной дифференцировочной среде StemPro® Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Осуществляли замену культуральных сред каждые 3-4 суток.

Через 21 день дважды отмывали изучаемые культуры с помощью фосфатного буфера. Адгезирующие клетки сушили на воздухе, фиксировали в парах формалина и окрашивали 2% водным раствором ализаринового красного S (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции фирмы-производителя для определения минерализации межклеточного матрикса. Негативным контролем дифференцировки служили 2D-культуры ССК в стандартной ППС, не контактировавшие с 3D-матриксом в течение 21 суток.

Дизайн эксперимента представлен на рис.6.

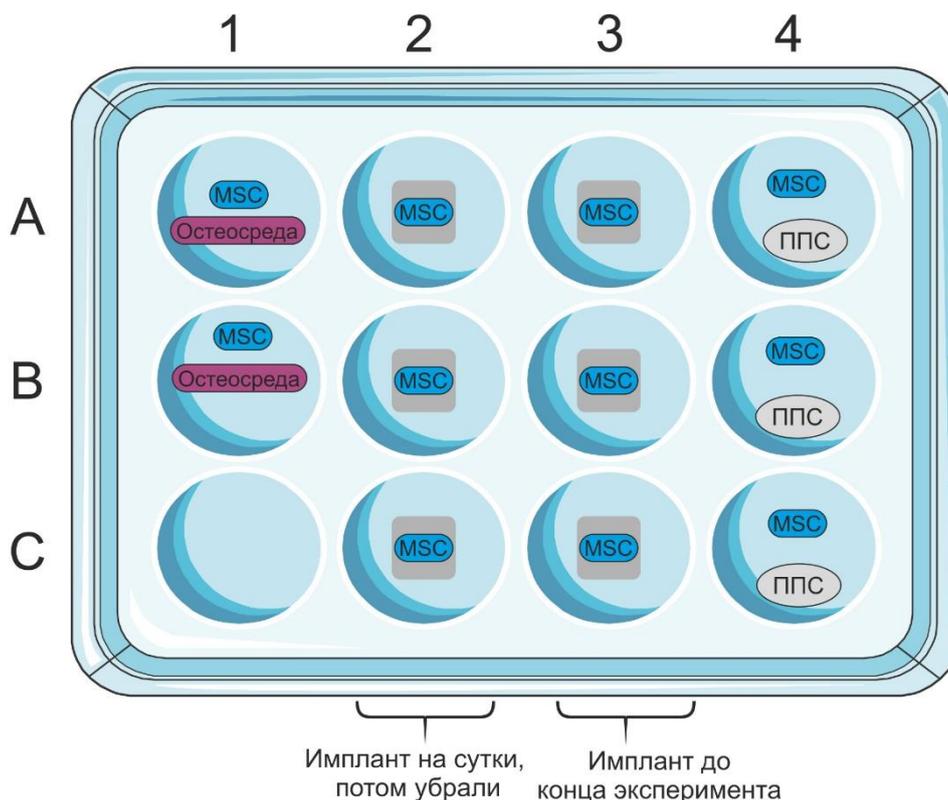


Рисунок 6. Дизайн эксперимента для выявления способности стромальных стволовых клеток формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру с помощью образцов с КФ-покрытием на титановой подложке.

Цитоморфометрическое исследование (площади, числа) окрашенных клеток проводили с использованием инструментов компьютерной программы Adobe Photoshop CS6 (Adobe Inc., США) согласно алгоритму, представленному в руководствах (Новицкий В.В. и др., 2004; Авантдилов Г.Г., 2006).

2.2.12 Оценка влияния гидроксиапатита на миграцию стромальных стволовых клеток с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP

Оценка направленной миграции ССК через поры в мембране (инвазия), имитирующие поры кровеносных сосудов, проводилась с использованием электродной системы непрерывного видеонаблюдения – xCELLigence® RTCA DP (ACEA Biosciences Inc., США). 16-луночный СИМ-планшет представляет собой систему 2 полостей, разделенных пористой мембраной (диаметр пор 8 мкм). В верхнюю часть планшета максимальным объемом 180 мкл помещали ССК, в нижнюю часть объемом 162 мкл помещали нанозвесь ГАП (1 мг/мл). Нижняя поверхность мембраны на 80% покрыта ячейками из золотых электродов. Изменения импеданса, снятого с этих электродов, показывают площадь пористой мембраны с обратной стороны, занятую

клетками на данный момент после инвазии через поры. Этот показатель визуализирует влияние наночастиц ГАП на положительную миграцию (инвазию) ССК в культуре клеток.

Все работы выполнялись в условиях стерильности, в ламинарном потоке воздуха. Для исключения температурного фактора штатив для сборки планшета заранее помещали в CO₂ инкубатор на сутки. В данном эксперименте применялась нановзвесь ГАП, так как объем нижней камеры СИМ-планшета слишком мал (168 мкл) для размещения ТiКФ образца. ГАП в нижней камере находился в стандартной культуральной среде aMEM (100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина; 300 мг/л L-глутамина, Sigma-Aldrich, США). В верхней камере использовалась та же питательная среда, заранее прогретая в CO₂ инкубаторе.

Для калибровки прибора xCELLigence® RTCA DP использовали 30 мкл среды, к которой впоследствии добавляли взвесь ССК в концентрации 4×10^4 клеток в 150 мкл среды. Контролем выступил планшет без добавления ГАП. Планшет находился 10 мин в CO₂ инкубаторе, после чего его устанавливали в RTCA DP Analyzer. Показания импеданса снимали каждые 15 мин в течении 25 часов. Для каждой экспериментальной группы использовали по 4 лунки.

2.2.13 Методы статистического анализа данных

При анализе, обработке и представлении данных использовалось программное обеспечение Prism 8.0.1 (Graphpad, USA). Нормальность распределения данных оценивали согласно гипотезе Колмогорова-Смирнова. В связи с тем, что выборки не подчинялись закону нормального распределения, для каждой выборки вычислялись такие критерии описательной статистики как медиана, первый и третий квартиль (Q1, Q3). Для оценки достоверности различий зависимых выборок был использован T-критерий Вилкоксона, для независимых выборок применяли U-критерий Манна-Уитни. Для выявления связей между исследуемыми показателями вычислялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена (объем выборки не позволял определить закон распределения). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (Кремер Н.Ш., 2004).

Для поиска данных об известных белок-белковых взаимодействиях была использована биоинформатическая база данных STRING (Версия 11.5). В анализ вошли

факторы, где при добавлении в культуру ТiКФ образца было отмечено значимое различие уровня продукции фактора по сравнению с контрольными культурами.

ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований

3.1 Способность стромальных стволовых клеток жировой ткани человека формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру с помощью образцов с КФ-покрытием на титановой подложке

Результаты показали, что 24 часов достаточно, чтобы ССК адгезировали к КФ поверхности TiКФ образцов, что делает возможным их перенос на образцах в ППС, не содержащую клетки. К 21-м суткам культивирования ССК созревают в остеобласты, что подтверждается окрашиванием клеточной культуры на КФ поверхности ализариновым красным (рис. 7А, ряд 3). Выявляется интенсивная окраска клеточной культуры по краям 3D-матрикса, а также вблизи них на пластиковой поверхности лунок планшетов. Это говорит о том, что ССК эмигрируют с КФ поверхности, заселяют свободную территорию на пластике, подвергаются остеогенной дифференцировке, занимая 20-32 % площади лунок планшета вокруг перенесенных 3D-матрикса (табл. 2, рис. 7Б). Рисунок 8Б демонстрирует, что клетки не просто смываются с КФ поверхности, а передвигаются на пластик с образцов, имеющих высоту не менее 1 мм (табл. 2), и формируют к 21-м суткам наблюдения трехмерную (3D) культуру остеобластов.

При этом именно прямой контакт ССК с КФ поверхностью индуцирует их остеогенную дифференцировку и созревание, поскольку в культуре клеток без образцов (рис.7А, ряд 4; рис.8Д) и после удаления 3D-матрикса из культуры (рис. 7А, ряд 2; рис. 8В) окраска остеобластов ализариновым красным не выявляется (табл. 2).

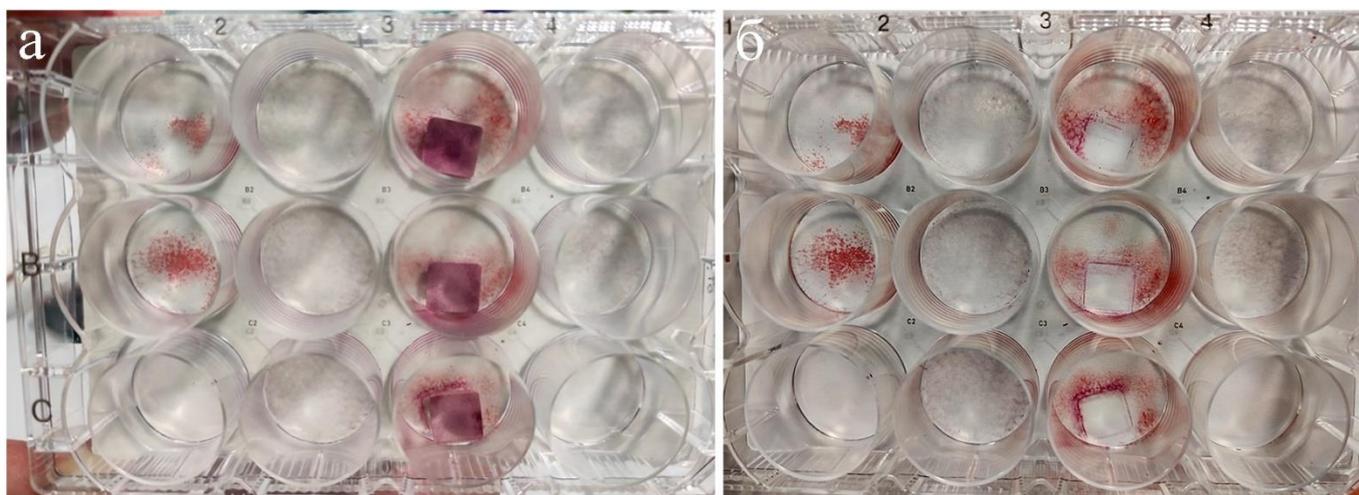


Рисунок 7 - Внешний вид 21-дневных клеточных культур в 12-луночных планшетах до (А) и после удаления (Б) титановых матриксов с кальцийфосфатным покрытием для выявления способности

стромальных стволовых клеток жировой ткани человека формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру. Окраска ализариновым красным S.

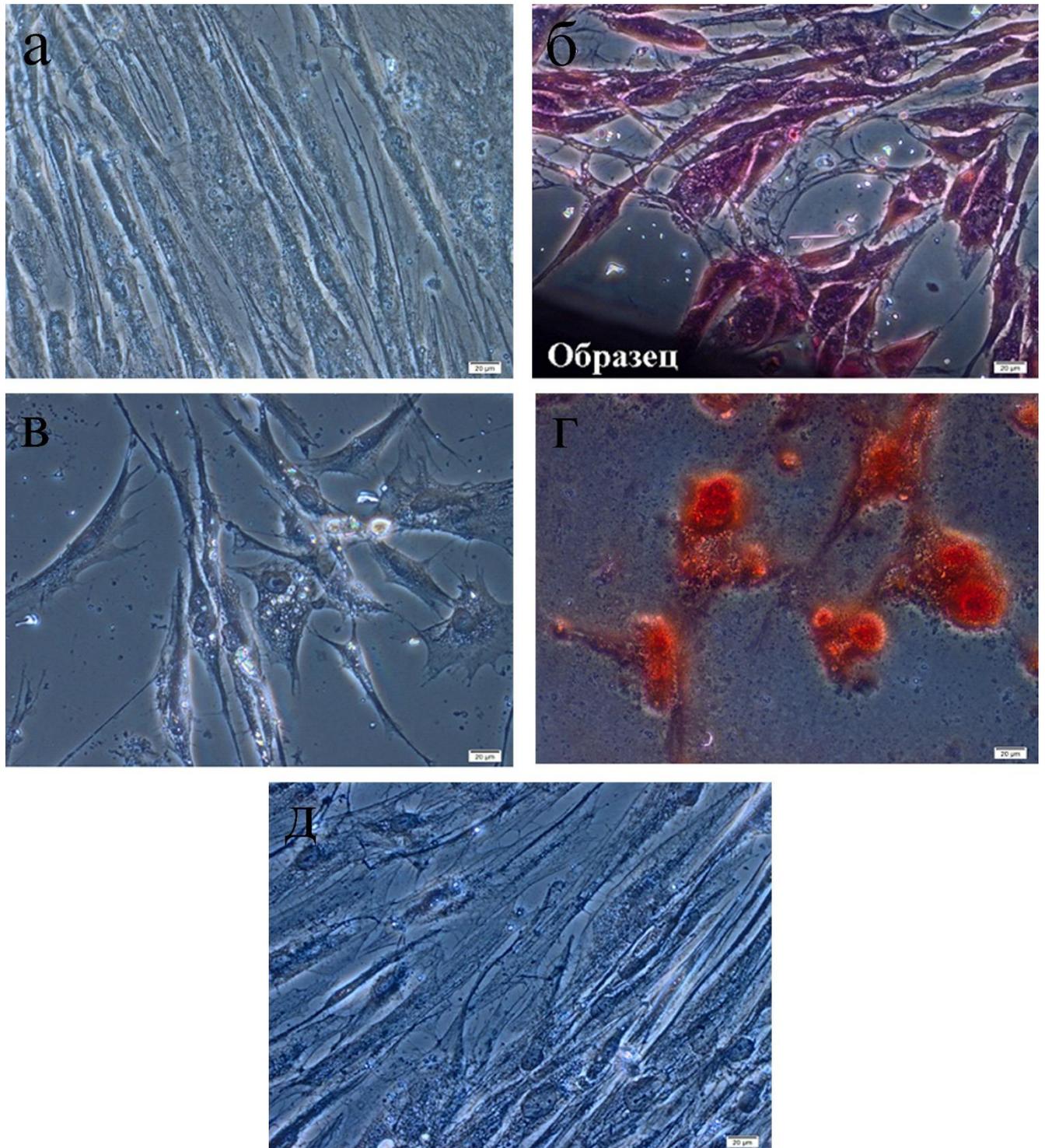


Рисунок 8- Микрофотографии 21-дневной культуры ССК жировой ткани человека при выявлении их способности формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру с помощью образцов с КФ-покрытием на титановой Ti подложке: а) состояние клеток до окраски. Окрашенные клетки (б-д): б) Эмиграция клеток с поверхности образца, перенесенного в бесклеточную ППС после 24 ч сокультивирования с ССК (ряд 3 планшета на рис.7); в) Состояние культуры клеток на пластике после удаления образцов через 24 ч культивирования (ряд 2 на рис.7); г) Позитивный контроль остеогенной дифференцировки и созревания клеток на пластике в остеогенной среде (ряд 1 на

рис.7); д) Негативный контроль остеогенной дифференцировки и созревания клеток на пластике в стандартной среде без остеогенных добавок (ряд 4 на рис.7). Окраска ализариновым красным S. Шкала 20 мкм, увеличение 100.

Таблица 2. - Показатели остеогенной дифференцировки и созревания ССК жировой ткани человека в 21-дневной культуре при контакте с титановым образцом, несущим кальцийфосфатное покрытие, или остеогенной средой, Me(Q1-Q3)

Группа исследования	Толщина титанового образца с кальцийфосфатным покрытием, мм			Суммарная площадь окраски клеток на пластике, % от площади лунки
Культура клеток с образцов, перенесенных в бесклеточную ППС через 24 ч сокультивирования с ССК (ряд 3 планшета на рис.3.0), n=9	1,1			30 (20,5 - 32)*
Культура клеток на пластике после удаления образцов через 24 ч культивирования (ряд 2 на рис.3.0)				0
Позитивный контроль остеогенной дифференцировки и созревания клеток на пластике в остеогенной среде				
Ряд 1 на рис.6-7, n=6	-	-	-	9 (7 – 17,5)
Негативный контроль остеогенной дифференцировки и созревания клеток на пластике в стандартной среде без остеогенных добавок				
Ряд 4 на рис.6-7	-	-	-	0

Примечание: Окраска ализариновым красным S. Компьютерную морфометрию проводили с использованием цифровой фотографии (рис.7Б); n - число измерений. В каждой лунке проведено по 3 измерения; *) - статистические различия ($p < 0,05$) со всеми группами исследования согласно критерию Манна-Уитни.

Интересно, что ССК окрашиваются ализариновым красным после прямого контакта с 3D-матриксом не так интенсивно, как в двумерной остеогенной дифференцировочной среде на пластике (рис. 7, ряд 1; 8Г), но площадь окраски более чем в 3 раза ($p < 0,05$) больше (табл.2). Это объяснимо, поскольку ССК в трехмерной культуре тратят значительное время на эмиграцию с TiКФ образцов и заселение лунок, поэтому не успевают к 21 суткам сформировать заметный кальцифицированный (минерализованный) межклеточный матрикс, окрашивающийся ализариновым красным, как в стационарной клеточной культуре в остеогенной среде.

Таким образом, TiКФ образцы способствуют *in vitro* индукции остеогенной дифференцировки и созревания ССК человека, их эмиграции с поверхности образцов,

заселению 30 % свободной территории вокруг образцов по типу "ползучего остеогенеза". В трехмерной культуре клеток обнаружена остеогенная дифференцировка вокруг образцов с растворимыми КФ, которая опосредована не только высвобождением ионов кальция и фосфора, но и ССК, эмигрирующими с образцов на пластик и предифференцированными в остеобласты после прямого контакта с КФ поверхностью.

3.2 Жизнеспособность стромальных стволовых клеток в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани

Оценка жизнеспособности клеточных культур ССК 5-го пассажа была произведена по прошествии 14 суток культивирования в 2D и 3D культурах. Вариации процента живых клеток составили 91%-95%. Доля апоптотических и некротических форм ССК варьировала в пределах 0,8-4% и 3,7-6,8%, соответственно. Значимых различий между группами обнаружено не было (табл. 3), что говорит об отсутствии цитотоксичности TiКФ образцов.

Таблица 3. Жизнеспособность ССК (%), выделенных из жировой ткани человека, через 14 сут культивирования в стандартной среде с образцами титановой подложки, несущими кальцийфосфатное покрытие, Me(Q1-Q3)

Количество живых клеток, %	Количество апоптотических клеток, %	Количество некротических клеток, %
Культура клеток без контакта с TiКФ образцами (контроль), n=6		
92,63 (91,11-95,47)	1,47 (0,89-2,35)	5,11 (4,06-6,24)
ССК+TiКФ образец, n=3		
91,83 (91,54-93,19)	3,17 (1,59-4,13)	4,27 (3,71-6,78)

3.3 Результаты растворимости 3D матрикса, имитирующего минеральное вещество костной ткани

Согласно полученным результатам, представленным в табл.4, TiКФ образцы не вызывают накопления продуктов биodeградации в 1-2-недельных экстрактах.

Таблица 4. Концентрации ионов (мМ) в экстрактах и изменения массы (мг) титановых образцов с микродуговым кальцийфосфатным покрытием в динамике растворения в среде RPMI-1640, Me(Q1-Q3)

Группа исследования	Показатели			
	[Ca] общий	[Ca ²⁺]	[PO ₄ ³⁻]	Прибавка массы образцов
7 дней растворения				
Растворитель (контроль), n=6	0,075 (0,050-0,100)	0,25 (0,23-0,26)	4,57 (4,38-4,64)	-
TiКФ образец,	0,09 (0,04-0,09)	0,23 (0,21-0,24)	4,77 (4,40-5,02)	0,11 (0,08-0,13)

n=3				
14 дней растворения				
Растворитель (контроль), n=6	0,045 (0,04-0,10)	0,23 (0,19-0,26)	4,69 (4,57-4,78)	-
TiКФ образец, n=3	0,08 (0,08-0,12)	0,26 (0,25-0,26)	4,71 (4,51-4,81)	0,25(0,16-0,25) *

Примечание: n – число исследованных образцов; *) статистически значимые различия ($p < 0,05$) с 7 днями растворения согласно критерию Манна-Уитни.

Концентрации тестируемых катиона и аниона не отличались значимо от значений в контрольной группе (среда RPMI-1640 без добавления образцов) при сроках растворения 7 и 14 суток (табл. 4). С другой стороны, отмечена прибавка массы TiКФ образцов в динамике теста на биodeградацию (табл. 4), что свидетельствует в пользу обратного осаждения (преципитации) ионов из раствора на КФ покрытие.

3.4 Иммунофенотип стромальных стволовых клеток в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани

По прошествии срока культивирования (14 суток), доля клеток, экспрессирующих гемопоэтические маркеры (**CD45⁺,34⁺,14⁺,20⁺**) в трехмерной (3D) культуре, двукратно превышала таковую в 2D группе сравнения ($p=0.0013$). Напротив, процент клеток, несущих маркеры ССК, снижался на 3-4 % после контакта с TiКФ образцами (табл.5).

Таблица 5. Иммунофенотип (%) стромальных стволовых клеток (ССК) жировой ткани человека, выделенных из жировой ткани человека, через 14 сут культивирования в стандартной среде с образцами титановой подложки, несущими кальцийфосфатное покрытие, Me(Q1-Q3)

Маркер\Группа	2D культура клеток (n=5)	3D культура клеток (n=7)
Гемопоэтические детерминанты		
CD45⁺,34⁺,14⁺,20⁺	0,33 (0,235 - 0,365)	0,69 (0,63 - 0,97)* p=0,0013
Маркеры стволовости ССК		
CD105⁺CD90⁺	98,46 (97,87 - 98,70)	94,02 (91,6 - 96,73)* p=0,0025
CD105⁺CD73⁺	96,59 (95,75 - 97,51)	93,45 (84,57 - 95,12)* p=0,0101
CD73⁺	95,73 (93,53 - 96,16)	92,32 (85,71 - 93,73)
CD105⁺	98,91 (98,76 - 99,1)	95,33 (93,6 - 97,74)* p=0,0025
CD90⁺	98,7 (98,33 - 98,84)	95,14 (92,83 - 97,31)* p=0,0025

Примечание. n — число исследованных образцов (лунок планшета); p— статистические различия с 2D культурой клеток (U-критерий Манна—Уитни).

В исходной (до 14-суточного культивирования) взвеси ССК после 5-го пассажа доля гемопоэтических клеток составляла 0,39%; число CD73, CD90 и CD105-

позитивных клеток - 96,03; 98,03 и 98,77%, соответственно. Другими словами, в 2D культуре, в отличие от 3D условий, СКК после 14 суток в стандартной питательной среде практически не теряли маркеров стволовости и не подвергались, по-видимому, массивной дифференцировке в остеобласты.

3.5 In vitro минерализация трехмерных культур стромальных стволовых клеток в условиях сокультивирования с матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани

Содержание фракций общего и свободного (ионизированного) кальция в трехмерной культуре статистически значимо снижалось (на 8 % и на 3,5 %) в сравнении с контрольной культурой СКК жировой ткани человека (табл.6), несмотря на присутствие КФ покрытия.

Таблица 6. Концентрации ионов (мМ) в супернатантах культуры стромальных стволовых клеток через 6 суток контакта с титановыми образцами с микродуговым кальцийфосфатным покрытием, Me(Q1-Q3)

Группа исследования	Ионы		
	[Ca] общий	[Ca ²⁺]	[PO ₄ ³⁻]
Культура клеток без контакта с TiКФ образцами (контроль), n=6	2,43 (2,41–2,53)	0,84 (0,83–0,85)	1,31 (1,28–1,41)
ССК+TiКФ образец, n=3	2,24 * (1,91–2,31)	0,81 * (0,80–0,82)	1,20 (1,14–1,30)

Примечание: n – число исследованных образцов; *) статистически значимые различия (p<0,05) с контролем согласно критерию Манна-Уитни.

Причиной может быть отложение малорастворимых фосфатов кальция на клетках (кальцификация) и преципитация (обратное осаждение) солей на TiКФ образцах. Подобное поведение СКК в in vitro культуре может свидетельствовать в пользу их дифференцировки в остеобласты, поскольку именно костные клетки контролируют процессы минерализации межклеточного матрикса.

Выявлено визуально, что в 3D модели значительно увеличивается интенсивность окраски и количество фокусов окрашивания ализариновым красным (рис. 9б) в процессе минерализации межклеточного вещества при сокультивировании СКК с TiКФ образцами. Межклеточное вещество в 2D культурах (рис. 9а) окрашивалось менее интенсивно. При этом в присутствии TiКФ образцов плотность распределения клеток на

пластиковой поверхности лунок планшетов значительно меньше, чем в аналогичной культуре без их добавления (рис. 9а,б).

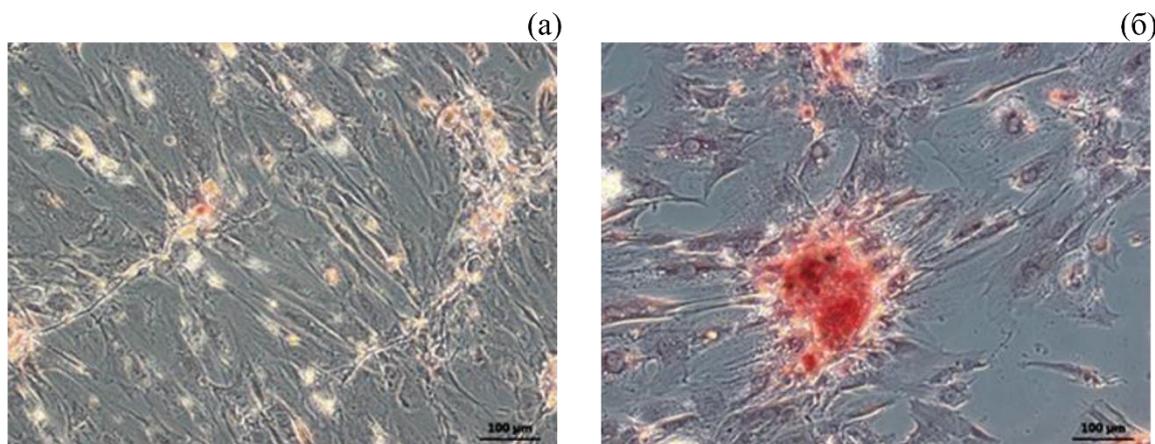


Рисунок 9 - Морфологическое состояние 21-суточной культуры стромальных стволовых клеток жировой ткани человека в стандартной среде DMEM/F12 при сравнительном окрашивании ализариновым красным участков минерализации межклеточного вещества: (а) 2D-культура клеток (контроль), (б) в присутствии 3D-матриц с КФ покрытием. Линейка в углу снимков соответствует 100 мкм.

Компьютерная морфометрия показала (табл. 7), что в 2D культурах не было обнаружено участков минерализации по прошествии 21 суток культивирования *in vitro*. Напротив, в 3D модели выявлены 156 участков минерализации на лунку; суммарная площадь минерализации в лунке составила около 60 мм², а площадь отдельных минерализатов достигала 0.0037 (0.0034-0.0043) мм² (табл. 7), что статистически значительно превышало соответствующие контрольные значения.

Таблица 7. Показатели минерализации внеклеточного матрикса в двух- или трехмерной 21-суточной *in vitro* культуре стромальных стволовых клеток жировой ткани человека, Me(Q1;Q3)

№	Группа исследований	Тестируемые показатели		
		Суммарная площадь участков минерализации в лунке, кв.мм	Площадь отдельных участков минерализации, кв.мм	Число участков минерализации в лунке
1	2D-культура ССК (контроль), n=4	0	0	0
2	3D-культура ССК, n=3	59,65* (21,26; 88,47)	0,0037* (0,0034; 0,0043)	156* (156; 208)

Примечание: n – число исследованных образцов; *) статистически значимые различия (p<0,05) с контролем согласно критерию Манна-Уитни.

Таким образом, в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани (сокультивирования с трехмерным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани) минерализация межклеточного вещества значительно усиливается, что свидетельствует в пользу дифференцировки ССК в секреторные остеобласты.

3.6 Секретия факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в культурах стволовых стромальных клеток, их связь с экспрессией генов в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани

Результаты мультиплексного анализа представлены в табл. 8. Согласно полученным данным, ССК в стандартной двумерной (2D) культуре секреторуют не менее 20 факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов.

Концентрации биомолекул, секреторимых в контрольной 2D-культуре, можно разделить, согласно Broek et al. (2014) (Broek L.J. et al., 2014), на следующие группы:

- высокие (более 1 нг/мл) концентрации (SCGF-b);
- средние (0,1-1 нг/мл) концентрации (HGF, MIF);
- низкие (1-100 пг/мл) концентрации (IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-16, IL-18, STACK, GROa, IFN-a2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIG, b-NGF, SCF, SDF-1a, TRAIL);
- минимальные (<1 пг/мл) уровни медиаторов (IL-1a).

Неопределяемые (0 пг/мл) концентрации биомолекул в 2D-культуре ССК не выявлены. Представленный спектр биомолекул характеризует ССК в стандартной питательной среде как культуру клеток с низкой секреторной активностью.

Таблица 8. Секреторная активность (пг/мл) стромальных стволовых клеток жировой ткани человека через 14 дней культивирования с титановыми подложками, несущими кальцийфосфатное покрытие, Me (Q1-Q3).

Определяемые биомолекулы	Двумерная (2D) культура, n=12	Трехмерная (3D) культура, n=18
Воспалительные цитокины		
IL-1a	0,07 (0 - 0,6725)	0,37 (0 - 0,8625)
IL-2Ra	17,84 (12,8-27,63)	8,48 (8,48-10,23) * p=0,001
IL-3	5,995 (5,49 - 7,88)	5,57 (3,763 - 7,295)
IL-12p40	30,59 (15,67 - 50,32)	38,04 (18,3 - 46,08)
IL-16	36,87 (30,8 - 48,29)	28,49 (20,06 - 33,12) * p=0,001
IL-18	6,43 (3,445 - 7,905)	9,795 (6,595 - 13,15)

		* p=0,0009
IFN-a2	17,75 (17,22 - 18,33)	17,6 (16,37 - 17,99)
Ростовые факторы		
M-CSF	15,95 (14,66 - 18,07)	15,03 (13,87 - 17,55)
b-NGF	8,595 (7,54 - 10,52)	7,71 (5,58 - 10,14)
HGF	372 (301,6 - 401,6)	265,7 (166,4 - 336) * p=0,0001
Хемокины		
LIF	13,08 (12,05 - 14,33)	13,01 (11,03 - 14,85)
MCP-3	75,68 (63,23 - 125,2)	84,56 (60,75 - 147,7)
MIF	646,4 (541,5 - 805,5)	652,8 (505,4 - 792,1)
MIG	9,54 (7,37 - 12,32)	12,28 (8,688 - 14,42)
GROa	39,06 (36,52 - 41,88)	45,38 (38,96 - 68,12) * p=0,0316
SCF	6,465 (3,843 - 8,73)	7,76 (4,32 - 10,39)
SCGF-b	15909 (12203 - 19013)	14604 (12334 - 20057)
SDF-1a	64,64 (45,35 - 83,64)	71,18 (61,19 - 132,6)
TRAIL	3,975 (2,888 - 4,73)	4,3 (3,43 - 5,73)
CTACK	42,31 (34,85 - 45,96)	46,38 (36,21 - 59,48)

Примечание: n – число исследованных образцов; *) статистически значимые различия ($p < 0,05$) с контролем согласно критерию Манна-Уитни.

Моделирование трехмерной (3D) культуры приводило к мало выраженному изменению секреторного профиля ССК жировой ткани человека (табл.8). Тем не менее, после 14 суток сокультивирования с ТiКФ образцами содержание в супернатантах IL-16, IL-2Ra и GROa снижалось на 23% ($p=0,001$), 52% (* $p=0,001$) и 29% ($p=0,0001$), соответственно. Напротив, концентрации IL-18 и GROa статистически значимо повышались до 152% и 116%, соответственно.

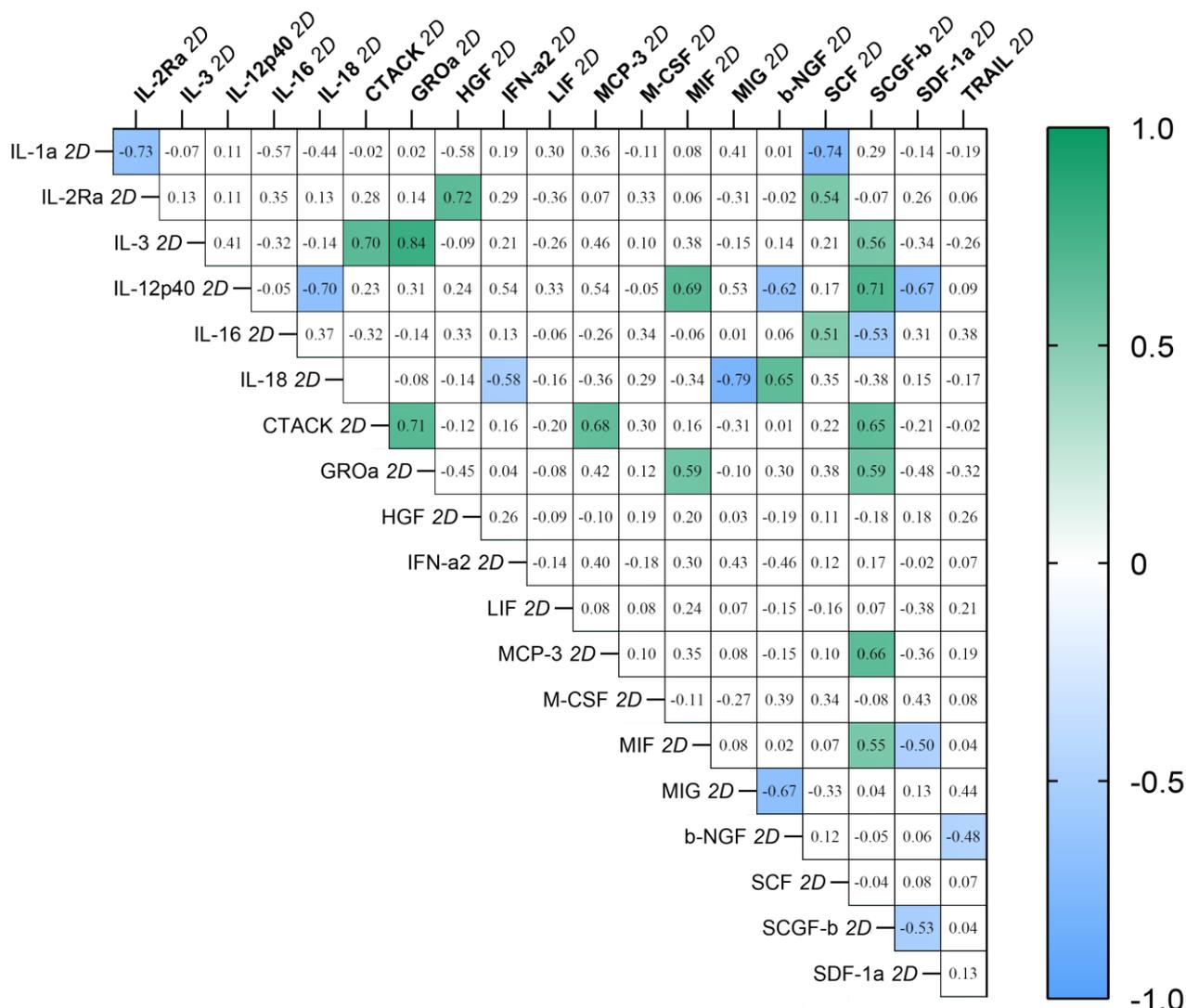


Рисунок 10. Корреляционная матрица, отражающая взаимосвязь концентрации исследуемых биомолекул в супернатантах контрольных культур стромальных стволовых клеток жировой ткани человека. Цветом отмечены значимые различия при $p < 0.05$. Значение в ячейках (r) характеризуют силу взаимосвязи.

По результатам проведенного корреляционного анализа, в контрольных 2D культурах ССК было выявлено девять сильных ($r > 0.7$) корреляционных взаимосвязей (Рис. 10):

- 1) Содержание IL-1a обратно коррелировало с уровнем IL-2Ra ($r = -0,73$);
- 2) Содержание IL-1a обратно коррелировало с уровнем SCF ($r=0.84$);
- 3) Содержание IL-2Ra прямо коррелировало с уровнем HGF ($r= 0.72$);
- 4) Содержание IL3 прямо коррелировало с уровнем CTACK ($r=0.70$);
- 5) Содержание IL3 прямо коррелировало с уровнем GRO α (CXCL1) ($r=0.84$);
- 6) Содержание IL-12p40 обратно коррелировало с уровнем IL-18 ($r= -0.70$);
- 7) Содержание IL-12p40 прямо коррелировало с уровнем SCGF-b ($r= 0.71$);

- 8) Содержание IL-18 обратно коррелировало с уровнем MIG ($r = -0.79$);
 9) Содержание СТАСК прямо коррелировало с уровнем GRO α (CXCL1) ($r = 0.71$).

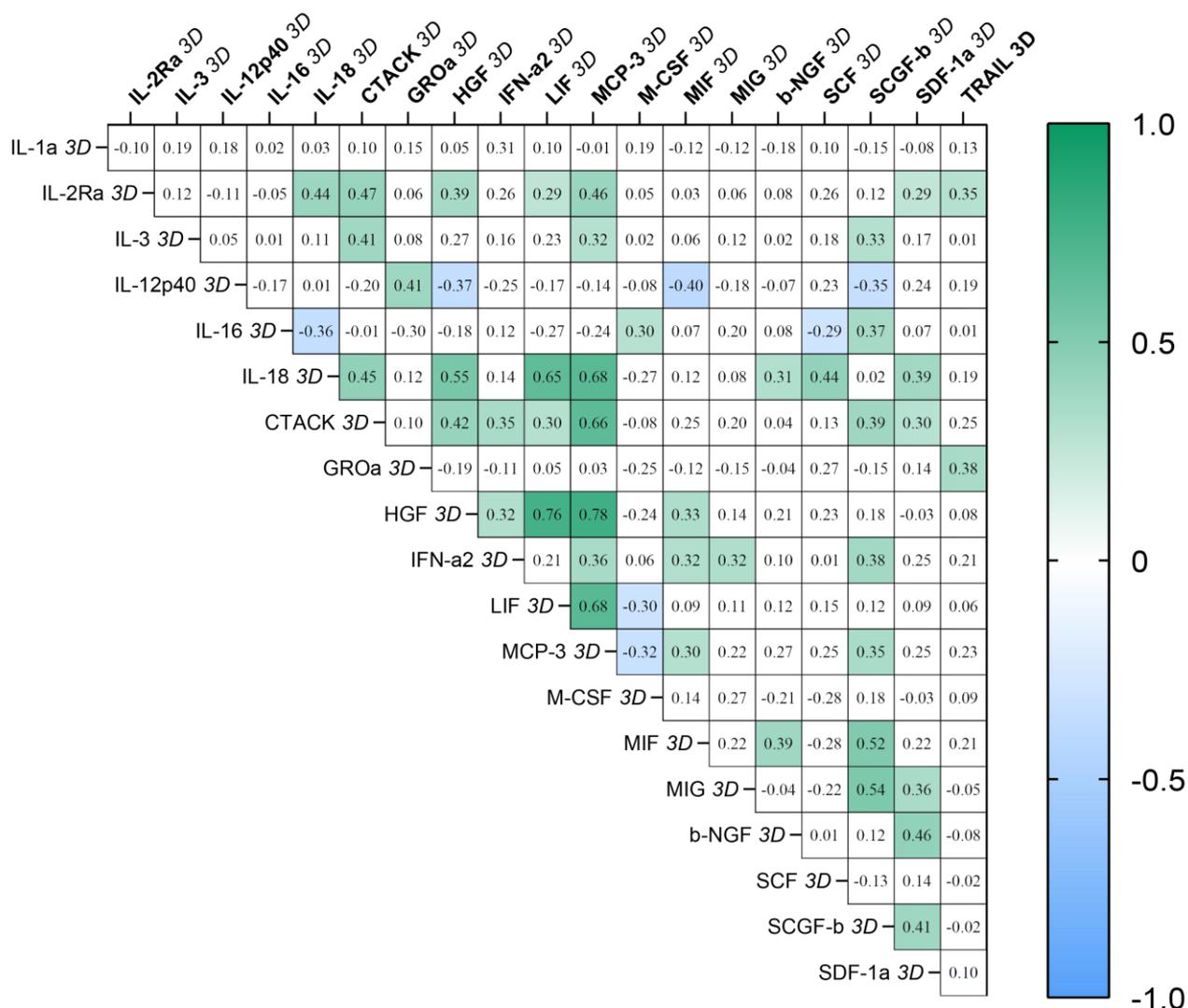


Рисунок 11. Корреляционная матрица, отражающая взаимосвязь концентрации исследуемых биомолекул в супернатантах 3D культур стромальных стволовых клеток жировой ткани человека при дистантном *in vitro* сокультивировании с матриксами с кальцийфосфатным микродуговым покрытием. Цветом отмечены значимые различия при $p < 0.05$. Значение в ячейках (r) характеризуют силу взаимосвязи.

По результатам проведенного корреляционного анализа, в 3D культурах ССК было выявлено всего две сильных ($r > 0.7$) корреляционных взаимосвязи (Рис. 11):

- 1) Концентрация HGF прямо коррелировала с уровнем LIF ($r = 0,76$);
- 2) Содержание HGF прямо коррелировало с уровнем MCP-3 ($r = 0,78$).

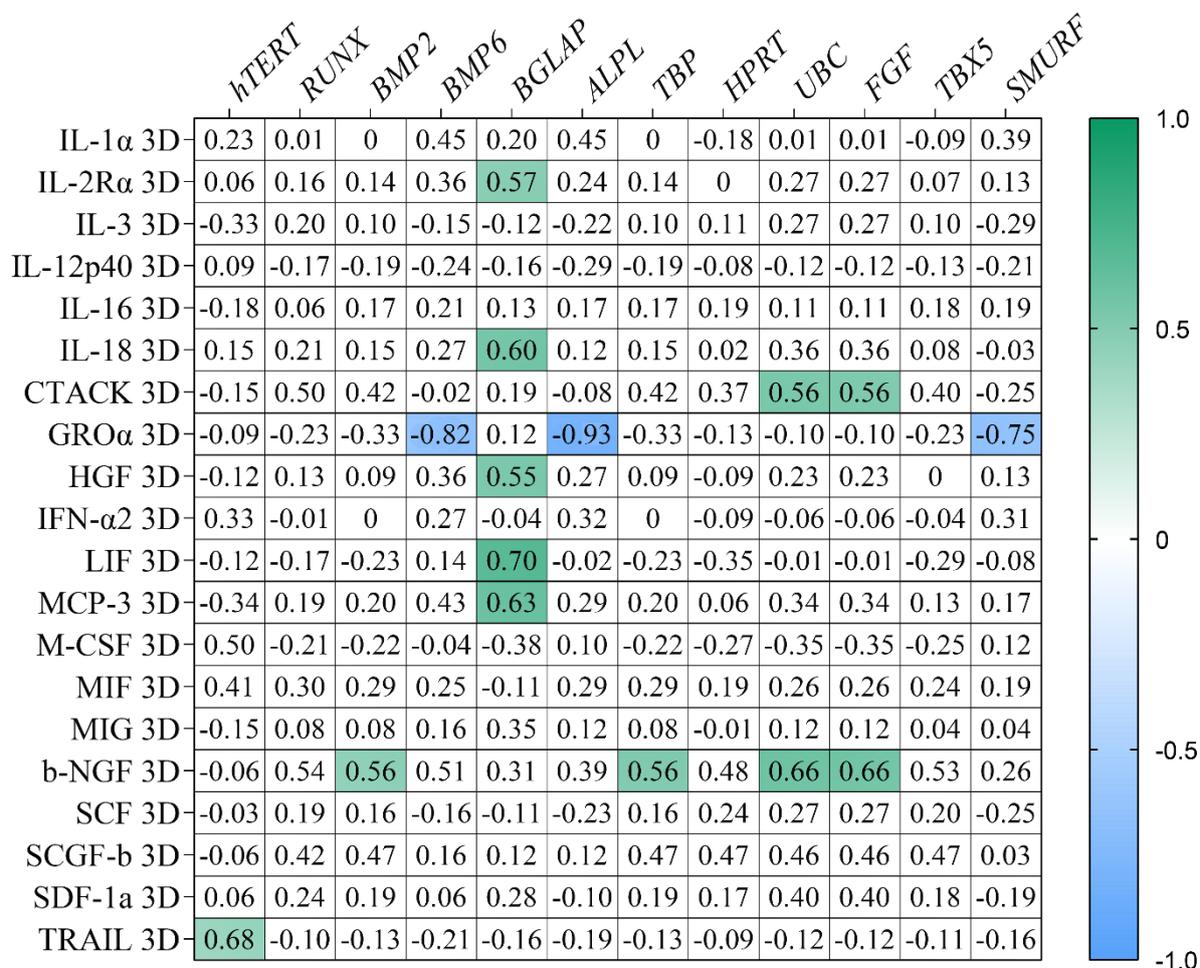


Рисунок 12. Корреляционная матрица, отражающая взаимосвязь экспрессии исследуемых генов и концентрации исследуемых биомолекул в супернатантах 3D культур стромальных стволовых клеток жировой ткани человека при дистантном *in vitro* сокультивировании с матриксами с кальцийфосфатным микродуговым покрытием. Цветом отмечены значимые различия при $p < 0.05$. Значение в ячейках (r) характеризуют силу взаимосвязи.

По результатам проведенного корреляционного анализа в 3D культурах ССК при сокультивировании с кальцийфосфатным микродуговым покрытием было выявлено три сильных ($r > 0.7$) корреляционных взаимосвязи концентраций секретируемых биомолекул с экспрессией тестируемых генов (Рис. 12):

- 1) GRO α (*CXCL1*) с *ALPL* ($r = -0.93$), *BMP6* ($r = -0.82$) и *SMURF* ($r = -0.75$).

3.7 Экспрессия генов в стромальных стволовых клетках в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани

ССК после 14-суточного контакта с TiКФ образцами показали повышение уровня экспрессии генов остеодифференцировки (*RUNX2*, *BMP6*, *ALPL*) и пролиферации (*hTERT*). Так, медианный уровень экспрессии *hTERT* при добавлении образцов

возрастал практически в 7 раз, *RUNX2*, *BMP6* и *ALPL* примерно в 1,5 раза (табл.9). Значимые различия в экспрессии других анализируемых генов не обнаружены.

Таблица 9 - Уровни относительной экспрессии генов в стромальных стволовых клеток жировой ткани человека при дистантном 14-суточном *in vitro* сокультивировании с образцами, несущими кальцийфосфатное покрытие, Me (Q1; Q3)

Определяемый ген	Уровень экспрессии трехмерная (3D) культура, n=7
<i>hTERT</i>	6,90(6,40; 56,5) *
<i>RUNX2</i>	1,44(1,07; 1,69) *
<i>BMP2</i>	1,05 (-1,40; 1,57)
<i>BMP6</i>	1,40(1,04; 1,69) *
<i>BGLAP</i>	-0,92 (-1,4; 1,69)
<i>ALPL</i>	1,43(1,03; 1,63) *
<i>TBP</i>	1,14(-1,42;1,66)
<i>HPRT</i>	1,37(-1,30;1,90)
<i>UBC</i>	1,07(-1,45;1,67)
<i>FGF</i>	1,06(-1,47;1,62)
<i>TBX5</i>	1,03(-1,33;1,51)
<i>SMURF</i>	1,10(-1,41;1,62)

Примечание: кратность (разы) экспрессии относительно референсного гена *RPLPO* получены при помощи оценки стандартной ошибки (SE) с помощью модифицированной формулы Пфаффа, (-) знак означает подавление относительной экспрессии гена по сравнению с контрольной культурой клеток на пластике без образцов, *) - $p < 0,05$ по сравнению с культурой клеток без исследуемых образцов по U-критерию Манна – Уитни

Таким образом, к 14-м суткам 3D моделирования регенерации костной ткани сохранялся выраженный генетический эффект в отношении экспрессии в каталитической субъединице теломеразы, свидетельствующей о клеточной пролиферации; в то же время, уже появилось обусловленное TiКФ образцами мягкое стимулирующее действие на активность ранних генов остеодифференцировки.

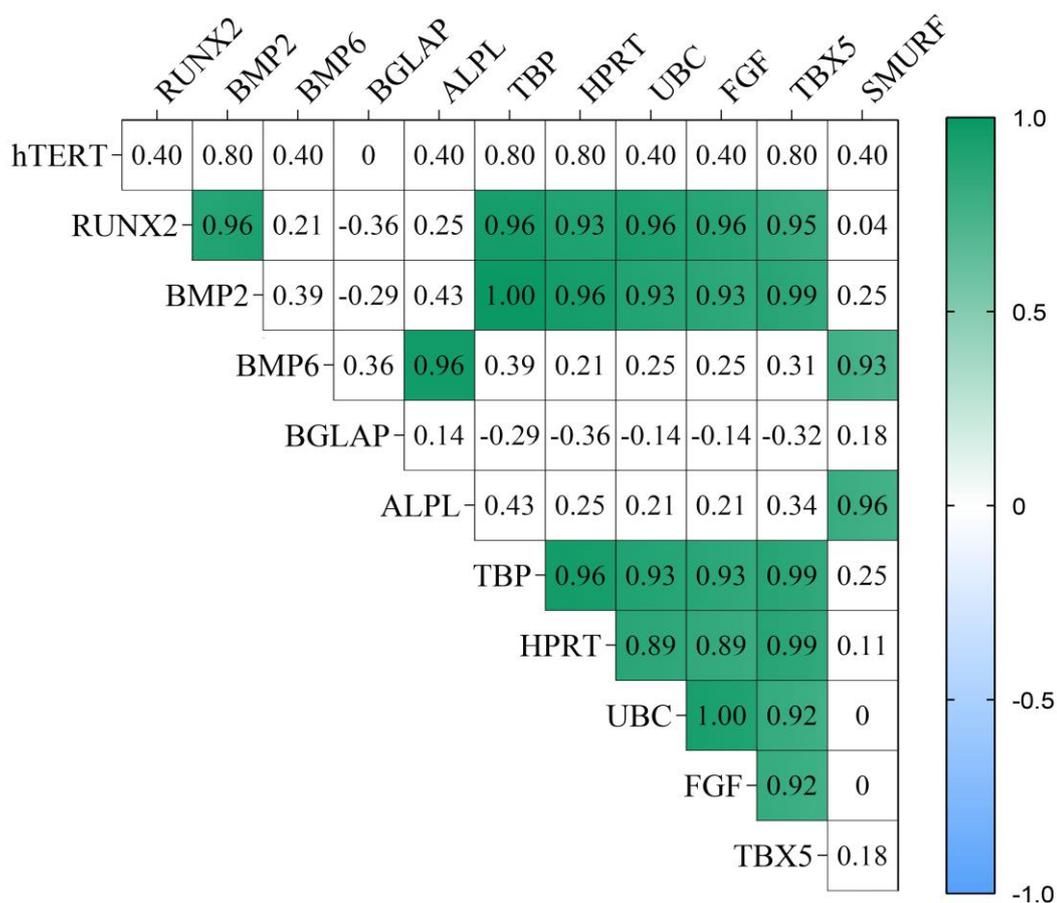


Рисунок 13. Корреляционная матрица, отражающая взаимосвязь экспрессии исследуемых генов в 3D культурах стромальных стволовых клеток жировой ткани человека при дистантном *in vitro* сокультивировании с матриксами с кальцийфосфатным микродуговым покрытием. Цветом отмечены значимые различия при $p < 0.05$. Значение в ячейках (r) характеризуют силу взаимосвязи.

3.8 Адгезия, морфология, миграция (таксис) и пролиферация стромальных стволовых клеток в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани

Адгезию, миграцию (таксис), пролиферацию и морфологию ССК проводили с использованием интегрированной платформы Cell-IQ® v2 MLF (CM Technologies, Финляндия) для *in vitro* визуализации живых клеток фазово-контрастным методом в реальном времени. Морфологическое состояние культур представлено на рис.14.

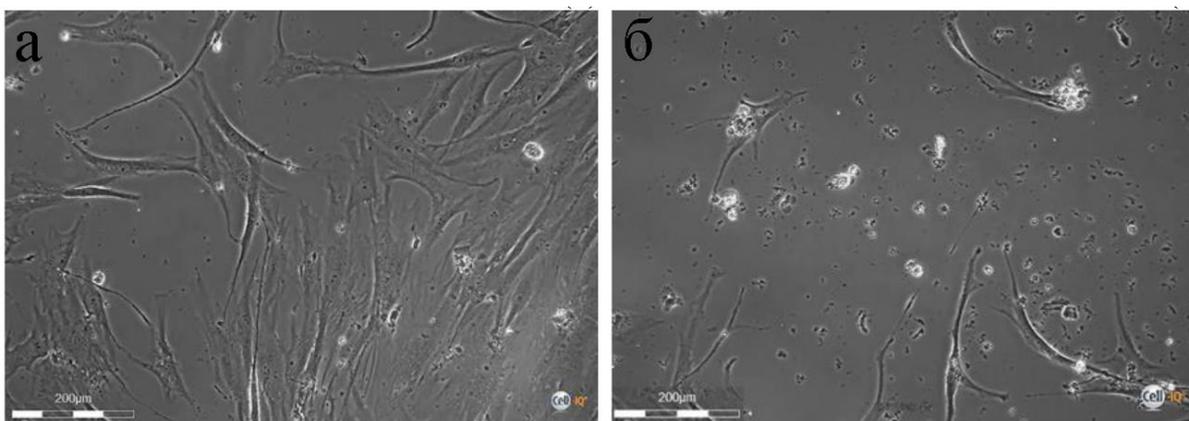


Рисунок 14. Морфологическое состояние культуры стромальных стволовых клеток жировой ткани человека в стандартной среде DMEM/F12 при фазово-контрастном Cell-IQ микропировании на 14-е сутки: а) контрольной 2D-популяции клеток, б) в присутствии TiKF образцов. Линейка в углу снимков соответствует 200 мкм.

Динамику изменения численности клеточной культуры в областях визуализации напротив образца можно условно разделить на 3 фазы. Первая фаза продолжительностью до 50 ч характеризовалась резким приростом числа клеток в областях визуализации. На второй фазе (50-180 ч исследования) клеточность культуры характеризовалась медленным ростом с последующим выходом на плато к третьей фазе, с показателем 120-140 клеток на точку визуализации (180-330 ч исследования) (Рис. 15). Значимых различий (согласно Т-критерию Вилкоксона) в поведении клеток между 2D и 3D культурами обнаружено не было.

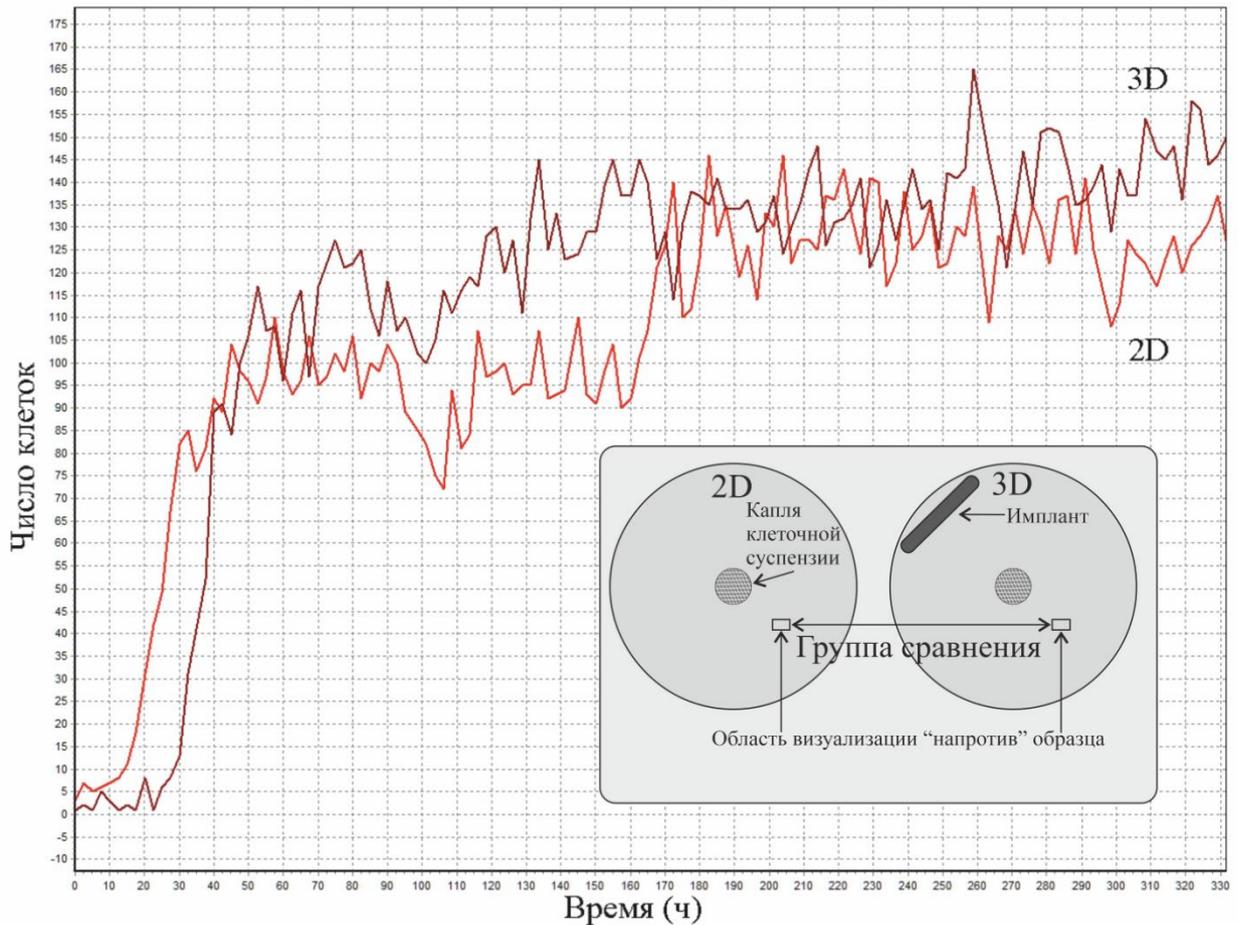


Рисунок 15. Изменение численности адгезирующих клеток в 2D и 3D культурах в области СЕИ-Ю визуализации напротив титановых образцов с кальцийфосфатным покрытием.

Динамику численности в точках визуализации вблизи TiКФ образцов (рис.15) также можно разделить на три фазы. Первая фаза (0-100 ч) характеризуется отсутствием роста числа клеток в связи с удаленностью от капли клеточной суспензии, исходно помещенной в центр лунок. На второй фазе (100-210 ч) клеточная масса медленно нарастала за счет миграции и деления ССК. На третьей фазе (210-330 ч исследования) в 2D группе было зафиксировано резкое увеличение числа визуализированных клеток (с 20 до 110 клеток), обусловленное заселением территории лунок. В 3D-культуре ССК в 3-ю фазу был зафиксирован менее выраженный рост клеточности (максимально с 20 до 52 клеток) (рис.16).

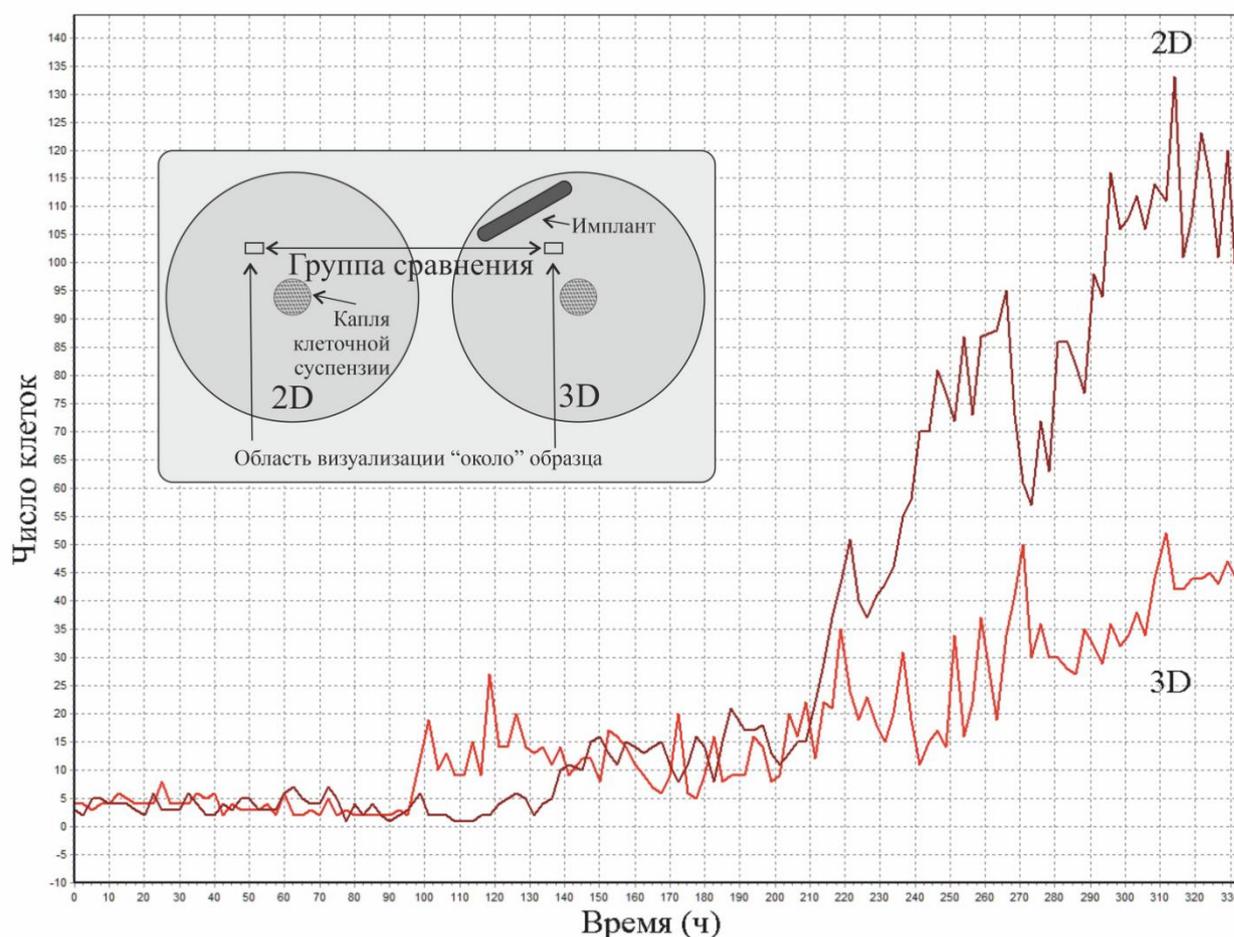


Рисунок 16. Изменение численности адгезирующих клеток в 2D и 3D культурах в области СЕИ-IQ визуализации вблизи титановых образцов с кальцийфосфатным покрытием.

Трехмерное (3D) сокультивирование ССК с матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани, способствовало развитию клеточной реакции, сопровождавшейся визуальным торможением направленной миграции ССК в сторону TiКФ образцов. Начиная с 210 ч наблюдения, отставание прироста клеточной популяции в 3D культуре достигало статистических различий с 2D культурой согласно T-критерию Вилкоксона (рис.16). Проведенный графический анализ совпадает с визуальными наблюдениями, представленными на рис.9 и рис.14.

Компьютерная морфометрия показала, что мало растворимое КФ покрытие, сформированное на титановой подложке, вызывало статистически значимое ($p < 0,05$) уменьшение (в 3,5-10 раз) накопления клеток по сравнению с 2D контролем (табл.11).

Изменения клеточной массы в различных участках клеточной культуры могут быть связаны с механизмами миграции/эмиграции, гибели и деления клеток. Выраженные

морфологические признаки клеточной смерти (адинамия, округление, сморщивание или набухание клеток) при Cell-IQ мониторинге не выявлены.

В связи с этим, для анализа пролиферативной активности и формирования монослоя был проведен подсчет числа поделившихся клеток, для каждой лунки вблизи и напротив ТiКФ образцов. Для этого были смонтированы видеоролики на основе всех полученных снимков в каждой точке визуализации (рис.5). При просмотре определялось время деления первой клетки в области наблюдения и численность клеток в этот момент. Далее подсчитывалось количество поделившихся клеток до образования монослоя, а также для последней поделившейся клетки определялось время деления и численность клеток в этот момент. Результаты представлены в табл. 10.

Таблица 10. Количество клеточных делений, время первого деления и изменение клеточности в культурах ССК жировой ткани человека в условиях 14-суточного культивирования в присутствии ТiКФ образцов, Me(Q1-Q3)

Параметр \ Группа	2D культура (n=10)	3D область напротив (вдали) ТiКФ образца (n=7)	3D область около ТiКФ образца (n=7)
Количество делений	16,5 (12,5 - 44,5)	7 (5 - 12) *p=0,002	0 (0 - 1) *p=0,001 **p=0,002
Время от первого деления до последнего (ч)	48 (28,25 - 196,5)	95 (24 - 150)	119 (44 - 169)
Изменение клеточности в области визуализации	82 (59,5 - 99,75)	63 (42 - 91)	2 (1 - 29) *p=0,001

Примечание: Cell-IQ-система непрерывной визуализации в реальном времени; n — число исследованных лунок планшета; *) — значимость различия с 2D культурой; **) - с областью визуализации напротив образца согласно U-критерию Манна—Уитни.

Согласно полученным результатам (табл.10), в области визуализации напротив (вдали) ТiКФ образца, расположенного вдоль бортика лунки планшета, обнаружено 7 делящихся клеток (по медиане) за 95 ч наблюдения, что в 2 раза меньше, чем в 2D культуре ССК, но больше в сравнении с таковым в точке визуализации около образца, в которой не было обнаружено клеточных делений за 119 часов наблюдения. При этом 16,5 делений клеток в лунках 2D контроля уложились в 48 ч, что говорит о высокой скорости пролиферации ССК жировой ткани человека.

Cell-IQ система непрерывного видеонаблюдения позволила установить (табл.11), что присутствие ТiКФ образцов приводит к замедлению (до 47 % от контроля) горизонтальной (по пластиковой поверхности) скорости движения ССК. 10-кратное

уменьшение клеточной массы на границе с КФ покрытием (точка вблизи образца), но не в противоположной от образца точке, подразумевает существенное торможение направленной миграции ССК в сторону 3D матриксов. До их поверхности добирались единичные клетки (табл.11). При этом вблизи образцов между мигрирующими ССК отмечены зоны скопления частиц (рис.14), связанные, по-видимому, с биодеградацией КФ покрытия.

Кроме того, вблизи TiКФ образцов ССК предпочитали не вступать в процесс деления в изученный период наблюдения (14 суток) в отличие от контрольной 2D культуры на пластике.

Таблица 11. Подвижность и время первого деления стромальных стволовых клеток жировой ткани человека в условиях 14-суточного культивирования в присутствии КФ покрытий на титановой подложке, Me (Q1-Q3)

Группа	Линейная скорость свободного движения клеток, мкм/час	Максимальное число клеток в поле зрения		Время начала деления клеток, ч	
		ТВ вблизи образца	ТВ в стороне, противоположной от TiКФ образца	ТВ вблизи образца	ТВ в стороне, противоположной от TiКФ образца
2D-культура (контроль), n = 5	47 (39-55)	100 (71,5—120)	135 (130—152,5)	79 (58—215)	28 (28—33)
3D-культура, n = 7	22 (17-34) P < 0,001	10 (5—50) P < 0,001	125 (125—140)	0 P < 0,001	38 (23—159)

Примечание. Cell-IQ-система непрерывной визуализации в реальном времени; n — число исследованных лунок планшета; P— значимость различия с контролем (U-критерий Манна—Уитни). В точке визуализации (ТВ) вблизи образца делящихся клеток в группах 2 и 3 не обнаружено.

Следует отметить тот факт, что в стороне, противоположной от TiКФ образца, показатели, представленные в табл.11, достоверно не отличались в 2D и 3D культурах ССК.

Таким образом, Cell-IQ система непрерывного видеонаблюдения позволила установить 10-кратное снижение клеточной массы на границе с TiКФ образцами, обусловленное замедлением направленной миграции ССК в их сторону и торможением

клеточного деления. При этом эффект ТiКФ образцов на поведение ССК в 3D культуре является короткоранговым, поскольку вдали от образцов ССК ведут себя подобно контрольной 2D культуре на пластиковой поверхности лунок планшета.

3.9 Инвазия ССК через микропоры с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP

График миграции представляет собой логарифмическую кривую описывающую динамику миграции ССК через пористую мембрану, имитирующую стенки кровеносных капилляров с высокой аппроксимацией ($R^2 = 0,93$). В среднем, время выхода логарифмической кривой на плато составило 2,5 часа. Кривая визуально разделяется на 2 участка с линейной зависимостью показателя клеточного индекса. Первый участок ($R^2 = 0,99$) характеризуется быстрым приростом индекса клеточной массы (ИКМ) (0,13 усл. ед./ч); на втором участке ($R^2 = 0,97$) скорость прироста ИКМ составила 0,01 усл. ед./ч (Рис. 17).

Мы предположили связь первого участка ИКМ с инвазией ССК из верхней камеры в нижнюю через микропоры полимерной мембраны, что имитирует эмиграцию подвижных клеток из кровеносного русла в ткани. Второй участок может быть обусловлен распластыванием ССК на поверхности электродов. В связи с малым временем наблюдения (25 ч) и минимальной питательной средой, не способствующей пролиферации клеток, вклад клеточного деления в ИКМ можно исключить. Данное предположение подтверждается Cell-IQ наблюдением, согласно которому 99% ССК начинают делиться со 2-х суток (см.выше).

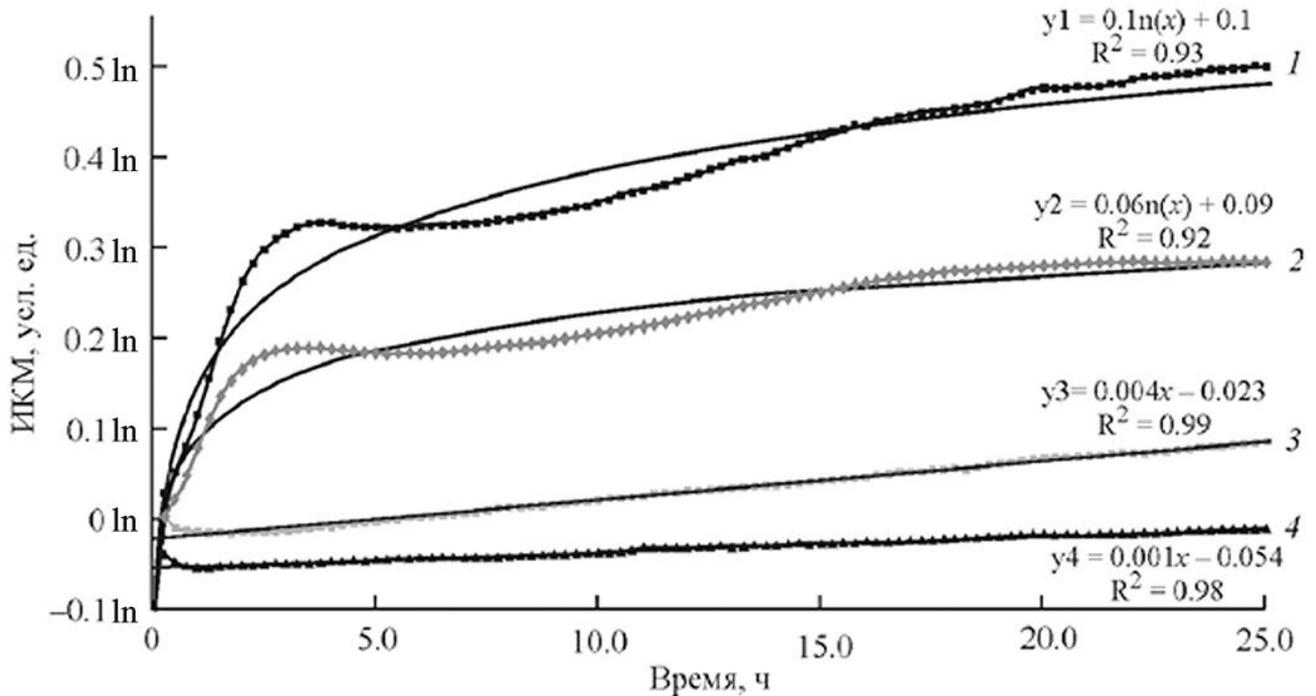


Рисунок 17. Экспериментальные кривые (1—4) и кривые регрессии (сплошные линии y_1 — y_4) изменения импеданса в RTCA системе, отражающего индекс клеточной миграции (ИКМ) стромальных стволовых клеток жировой ткани человека через микропористую мембрану (y_1) в присутствии нановзвеси гидроксиапатита (y_2). Кривые 3 и 4 показывают изменения импеданса, когда в верхней камере нет клеток; в нижней камере находятся либо нанодисперсия ГАП (y_3) либо стандартная культуральная бесклеточная среда (y_4).

Моделирование потенциального хемотаксиса ССК в зону регенерации костной ткани, сопровождающегося высвобождением продуктов деструкции, включая ионы и частицы ГАП, показало интересные результаты. Концентрация наночастиц ГАП 1 мг/мл без прямого контакта с ССК достоверно (в 1,7 раза, $P_T < 0,001$) снижала скорость клеточной инвазии из верхней в нижнюю лунку RTCA системы на всех участках наблюдения (рис.17). К концу эксперимента ИКМ в контроле (ССК без нанодисперсии) практически в 2 раза превышал аналогичный индекс для группы ССК+ГАП, что предполагает уменьшение числа и/или площади клеток, прилипших к электроду.

Таким образом, согласно RTCA данным, наночастицы синтетического ГАП, как и объемные образцы с микродуговым КФ покрытием в Cell-IQ тесте, без прямого контакта с ССК жировой ткани человека снижают их подвижность.

ГЛАВА 4. Обсуждение результатов

Скоординированные взаимодействия с гуморальными факторами, другими клетками и внеклеточным матриксом определяют локальную нишу стволовых клеток со сложной динамической регуляцией (Discher D.E. et al., 2009). Считается, что ССК, в основном, проявляют остеогенный потенциал за счет растворимых паракринных биомолекул и внеклеточных везикул. Качественный состав секретома в ССК варьирует в разных условиях. Эти секретлируемые компоненты играют решающую роль в улучшении выживаемости клеток, регуляции регенерации поврежденных тканей (Rahimi B. et al., 2021).

Кроме того, ССК, реагируют на (био)механические сигналы, что является важной областью исследований под общим названием «механотрансдукция». Так, достаточно механических воздействий, без дополнительных биохимических стимулов, чтобы способствовать дифференцировке и созреванию постнатальных ССК (Mathieu P.S., Lobo E.G., 2012). Например, циклический механический стресс в форме колебательного потока жидкости (Sen B. et al., 2014) сдвигает баланс процессов коммитирования с адипогенеза на остеогенез, способствует формированию костной и мышечной ткани *in vivo* и *in vitro* (Gurkan U.A., Akkus O., 2008). Согласно Prowse P.D. (2013), топография искусственного матрикса регулирует остеогенную дифференцировку ССК путем изменения цитоскелета. (Prowse P.D. et al., 2013). При этом, показано, что распределение актинового цитоскелета различно на поверхностях с вариациями шероховатости (Lüthen F. et al., 2005).

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что при локальном внесении взвеси ССК жировой ткани человека в центр лунки в условиях 2D культивирования, клетки хорошо адгезировали, принимали фибробластоподобную морфологию (рис.18а), мигрировали и пролиферировали (табл.11), достигая состояния монослоя к 14 суткам наблюдения. Клетки вступали в межклеточные контакты, что тормозило их двигательную и пролиферативную активность и соответствующий прирост клеточной массы в точках визуализации (рис.15).

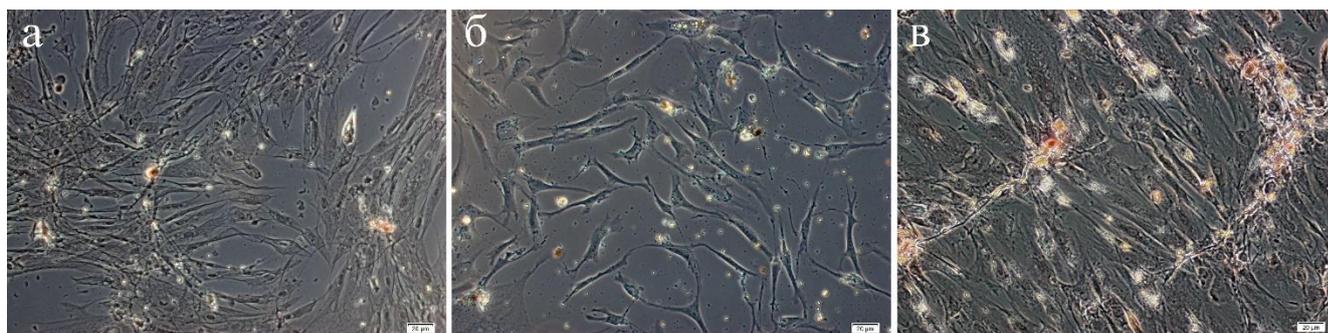


Рисунок 18. Морфология ССК после 14 суток культивирования а) в полной питательной среде без остеогенных добавок; б) при сокультивировании с имплантатом; в) при культивировании в остеоселективной среде.

Известно, что наряду с межклеточными контактами, внеклеточный матрикс в значительной степени контролирует поведение ССК, включая их движение, адгезию, пролиферацию, дифференцировку и созревание, а также метаболизм и жизнеспособность (Wang Y.K., Chen C.S., 2013). Действительно, добавление в клеточную культуру 3D-матриц с КФ покрытием, симулирующим состояние минерального вещества регенерирующей костной ткани, оказывало комплексное модулирующее влияние на морфофункциональное состояние культуры ССК. Этот эффект не был связан с токсичностью применяемых TiКФ образцов, так как результаты цитотоксического теста оказались сходными в 2D и 3D культурах клеток (табл.3).

4.1 Способность стромальных стволовых клеток жировой ткани человека эмигрировать с рельефного КФ покрытия на титановой подложке и формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру

Рельеф микродугового КФ покрытия способствуют эпигеномному переключению дифференцировки ССК жировой ткани человека в остеогенном и, в меньшей степени, хондрогенном направлениях, в ущерб образованию адипоцитов на КФ поверхности (Khlusov I.A. et al., 2018). Наши результаты подтвердили дифференцировку и созревание ССК жировой ткани человека в остеобласты при прямом контакте с данным видом КФ покрытия. В то же время, удивительным оказался факт, что часть стволовых клеток эмигрирует с поверхности TiКФ образцов высотой не менее 1 мм и заселяет 30 % свободной территории вокруг образцов (рис.7,8; табл.2) по типу "ползучего остеогенеза" (остеокондукции) (Kübler N.R., 1997).

Получены данные, требующие детальной расшифровки. Предполагаемым механизмом может быть схождение клеток вместе с растворением самого покрытия,

которое особенно интенсивно протекает как раз на краях образцов в зоне так называемых "концентраторов напряжения" (Шаркеев Ю.П. и др., 2014).

Поэтому значение продуктов биodeградации TiKФ образцов для реализации механизмов остеодифференцировки ССК жировой ткани человека представляло непосредственный интерес.

4.2 Роль биodeградации KФ матрикса в способности стромальных стволовых клеток жировой ткани человека формировать *in vitro* остеогенную культуру

Cell-IQ система непрерывного микроскопического наблюдения за клетками позволила установить, что эффект TiKФ образцов на функциональную (двигательную и пролиферативную) активность ССК зависит от расстояния. Так, динамика изменения клеточности в точке визуализации 01 (в противоположной стороне от образца, рис.5, табл.10) достоверно не отличается в контроле (2D культура) и 3D культуре, моделирующей трехмерную регенерацию костной ткани. В то же время, вблизи TiKФ образцов (точка 02, рис.5) после 210 ч наблюдения в 3D культуре резко замедляется прирост клеточной массы ($p < 0.01$, по сравнению с 2D моделью согласно T-критерию Вилкоксона; рис.16) до 10-кратных различий к 14-м суткам за счет торможения числа клеточных делений до нуля (табл.10) и линейной скорости клеточной миграции (табл.11). За время эксперимента до 3D-матрикса добирались единичные клетки; при этом были зафиксированы зоны скопления микрочастиц между мигрирующими клетками (рис. 14б). Дистантный (опосредованный) эффект TiKФ образцов на подвижность и пролиферацию ССК жировой ткани человека оказался короткоранговым, что обусловлено сбалансированными процессами растворения покрытия до ионов кальция и фосфата, и обратного их осаждения на KФ поверхность. При этом ионная преципитация преобладала, что вызвало рост массы образцов к концу наблюдения (табл.4).

В свою очередь, RTCA исследование показало, что наночастицы ГАП в концентрации 1 мг/мл без прямого контакта с ССК уменьшали скорость вертикальной миграции клеток через поры в мембране (инвазия) на всех участках наблюдения (рис. 17) системы RTCA в 1.5 раза ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной пробой без ГАП.

По данным рентгенофазового анализа, микродуговые KФ покрытия не имеют в своем составе ГАП, однако, содержит атомы фосфора и кальция, а также фазу монетита (CaHPO_4). Хотя точный механизм остеоиндукции, обусловленной KФ материалами, в

настоящее время неизвестен, установлена взаимосвязь между растворением материала и его остеогенностью (Yuan H. et al., 2010).

В целом, динамика кальция в ССК и его роль в дифференцировке остеобластов еще не полностью выяснены (Parrington J., Tunn R., 2014; Sun S. et al., 2007). Однако, становится очевидным, что остеодифференцировка ССК, выделенных из костного мозга человека, сопровождается экспрессией Ca^{2+} -связывающих белков (Carlier A. et al., 2011).

Если ССК теряет способность к делению и миграции, но сохраняет свою жизнеспособность, значит, она должна активировать процессы дифференцировки и созревания, заложенные в ее генетической программе (Aerts F., Wagemaker G., 2006). Переключателем сценариев "судьбы" (поведения) стволовых клеток могут быть, как минимум, ионы Ca^{2+} . Так, ионы кальция способны стимулировать минерализацию матрикса через кальций чувствительный рецептор, что приводит к ограничению подвижности клеток и дифференцировке ССК в остеобласты (Theman T.A., Collins M.T., 2009). Повышение концентраций внеклеточного кальция способствует высвобождению внутриклеточного иона из эндоплазматического ретикулума через кальций-чувствительный рецептор (Dvorak M.M., Riccardi D., 2004) и/или входу Ca^{2+} внутрь клетки через потенциал-зависимые каналы (Zayzafoon M., 2006). В свою очередь, это обеспечивает контроль пролиферации через c-fos транскрипционный фактор, остеогенную дифференцировку и созревание посредством экспрессии мРНК RUNX2, BMP-2, BMP-4 и ALP через NFAT-сигнальный транскрипционный каскад (NFAT - ядерный фактор активированных Т клеток (nuclear factor of activated T cells) (Zayzafoon M., 2006).

Действительно, наши результаты показали, что при дистантном сокультивировании ССК с ТКФ образцами в межклеточной жидкости (супернатантах) достоверно уменьшается содержание фракций кальция (общей и свободной) (табл.6), несмотря на его постоянный выход из КФ покрытия. Подобное поведение ССК жировой ткани человека в *in vitro* культуре может свидетельствовать в пользу их дифференцировки в остеобласты, поскольку по дизайну эксперимента только костные клетки могут контролировать межклеточные потоки кальция посредством отложения малорастворимых фосфатов кальция (кальцификации) на клетках и в межклеточном веществе (Риггз Б., Мелтон III, 2000)). При этом значительно усиливались (по площади и количеству фокусов окрашивания, в сравнении с 2D культурой) характерные для

остеобластов процессы минерализации межклеточного вещества (рис. 9, табл.7), выявляемые с помощью окраски ализариновым красным (Bourin P. et al., 2013; Dominici M., 2006).

Тем не менее, при блокировке кальциевых каналов, остеодифференцировка проходит, но в меньшей степени. Это свидетельствует о наличии иных путей проникновения кальция в ССК, которые предстоит изучить (Ye B., 2010). В частности, с использованием фазово-контрастной Cell-IQ микроскопии показано, что визуально определяемые микрочастицы, образующиеся в процессе биодеградации КФ покрытия, присутствуют в среде и внутриклеточном пространстве. При контакте с частицами КФ покрытия, ССК фагоцитируют микрокристаллиты, что, по-видимому, ингибирует их пролиферацию и миграцию после контакта (табл. 11). Другими словами, фагоцитоз может быть еще одним механизмом поступления кальция внутрь стволовых клеток и запуска их морфофункциональной трансформации в остеобласты.

Таким образом, продукты деградации 3D-матрикс с КФ покрытием (ионы, микрочастицы) являются близкодействующими триггерами *in vitro* дифференцировки и созревания части пула ССК жировой ткани в секретирующие остеобласты, с последующей минерализацией (кальцификацией) межклеточного матрикса.

4.3 Роль сети межмолекулярных взаимодействий в механизмах морфофункциональных реакций стромальных стволовых клеток жировой ткани человека в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани

Минерализация (преимущественно, кальцификация) межклеточного вещества культуры ССК, обусловленная их дифференцировкой и созреванием в остеобласты при взаимодействии с микродуговым КФ покрытием протекает в условиях ауто- и паракринной секреции регуляторных биомолекул, изменения иммунофенотипического профиля стволовых клеток и экспрессии генов.

По данным литературы, примесь гемопоэтических стволовых клеток присутствует в первичной культуре ССК (Jing D. et al., 2010). Дифференцировка ССК в остеобласты способствует формированию "остеобластных ниш", которые, в свою очередь, активируют процессы гемопоэза (Taichman R.S., 2005). В связи с этим, двукратный рост (с 0,33% до 0,69%, $p=0,0013$) в 3D культуре числа клеток с кроветворным иммунофенотипом на фоне падения экспрессии маркеров стволовости CD73, CD90 и

CD105 (табл.5,6) отражает, как и минерализация межклеточного матрикса, выраженную дифференцировку части ССК жировой ткани человека в остеобласты.

ССК секретируют большое количество цитокинов, регулирующих различные процессы клеточного гомеостаза. Однако, в современной литературе все еще недостаточно информации о полном секретоме ССК, зачастую исследователи не определяют более пяти цитокинов / факторов роста одновременно. Данные, представленные в современной периодике, часто противоречат друг другу. Потенциальные остеогенные эффекты воспалительных и регенераторных медиаторов на внеклеточный матрикс и механизмы их регулирования изучены недостаточно.

Жизнеспособность и функционирование ССК зависит от условий микросреды, в частности, гипоксия, изменения цитокинового профиля биологических жидкостей и клеток микроокружения изменяют биологию ССК (Méndez-Ferrer S. et al., 2010). Сеть медиаторов, образованная не только ССК, но и клетками тканевого микроокружения (Vallés G. et al., 2020), способна существенно влиять на остеогенные свойства ССК. Пока не ясно, но представляет большой интерес, реализуется ли остеомодулирующий эффект этой сети биомолекул посредством ее собственных сигнальных путей, или за счет модуляции активности известных генов остеодифференцировки ССК.

Результаты модельного эксперимента позволяют предположить, что 14-й день *in vitro* культивирования ССК в контакте с шероховатым микродуговым КФ покрытием является переломной точкой окончания провоспалительной фазы, которая характеризуется процессами клеточной миграции и пролиферации, и началом дифференцировки стволовых клеток в секретирующие остеобласты.

Оценка содержания цитокинов, хемокинов и факторов роста в супернатантах клеточных культур (табл.8) позволила установить, что при сокультивировании ССК жировой ткани человека с трехмерным матриксом изменяется их секреторная способность в сравнении с 2D культурами. Повышение (в 1,5 раза) содержания провоспалительного цитокина IL-18 в среде культивирования в условиях 3D культуры способно инициировать процессы остеогенной дифференцировки (Amarasekara D.S. et al., 2021). Кроме того, усиленная секреция IL-18 стромальными клетками подавляет остеокластогенез (Cornish J. et al., 2003).

Отмечено значимое повышение уровня секреции провоспалительного хемокина GRO α (CXCL1) являющегося медиатором хемотаксиса ССК (Pu Y. et al., 2017). Также

GROa способен проявлять остеокластогенную активность (Hardaway A.L. et al., 2015). Увеличенная секреция GROa может свидетельствовать об окончании провоспалительной фазы и переключении на остеогенные процессы (Loi F. et al., 2016).

В условиях растущей сети цитокинов и хемокинов, обладающих остеомодулирующими свойствами (IL-18, CXCL1) (Hardaway A.L. et al., 2015), а также функцией сигнальных молекул кроветворных ниш (SCF) (He N. et al., 2014), протекает ремоделирование костного матрикса и закладка новых микротерриторий для гемопоэтических стволовых клеток.

Стоит отметить, что низкие концентрации потенциальных триггерных молекул измерялись в общем объеме (1,5 мл) культуральной среды. Однако, вблизи отдельных клеток и формирующихся кроветворных микротерриторий, локальные концентрации данных факторов могут достигать огромных значений.

По данным корреляционного анализа (рис.10-11), выявлены качественные изменения сети биомолекул в 3D культуре ССК. Так, в контрольных культурах установлено 9 сильных корреляционных взаимосвязей, а в 3D - обнаружено только 2 сильных связи. Так, в 3D культурах содержание HGF фактора роста, участвующего в развитии органов в эмбриогенезе и регенерации тканей, было значимо снижено, однако содержание HGF прямо коррелировало ($r= 0,76$, $p<0,05$) с уровнем фактора ингибитора лейкемии (LIF), оказывающим иммуномодулирующий эффект на культуру ССК (Nasef A. et al., 2008), и хемотаксическим белком моноцитов-3 (MCP-3) ($r= 0,76$, $p<0,05$) оказывающим эффект хоуминга на ССК (Schenk S. et al., 2007). В то же время, ген фактора роста гепатоцитов человека (*HGF*), по механизму обратной связи с концентрацией регулируемого белка, может активироваться, участвуя при этом в регенерации костной ткани (Zhen R. et al., 2018).

Согласно полученным нами результатам (рис.12), в 3D культуре LIF прямо коррелировал с основным фактором формирования кости - геном остеокальцина *BGLAP* ($r= 0,70$, $p<0,05$). В условиях 2D культуры таких закономерностей обнаружено не было.

По результатам работы было выявлено 12 характеристик ССК жировой ткани человека, значимо отличавшихся в сравниваемых группах 2D и 3D культивирования *in vitro* (рис.19-20). По проведенному биоинформационному анализу базы данных вероятных межмолекулярных взаимодействий (Анализ по базе данных String) была получена молекулярная сеть, состоящая из 28 связей между анализируемыми факторами

стволовых клеток. В среднем каждый представленный белковый фактор имеет 4,67 связи: 8 из 12 факторов (66%) вовлечены в общие процессы клеточной дифференцировки, другие 3 фактора (*RUNX2* и *BMP6* гены, HGF) напрямую связаны с дифференцировкой СКК в остеобласты (рис. 19). Кроме того, *RUNX2*, *BMP6* и *ALPL* являются позитивными факторами (маркерами) функций костных клеток.

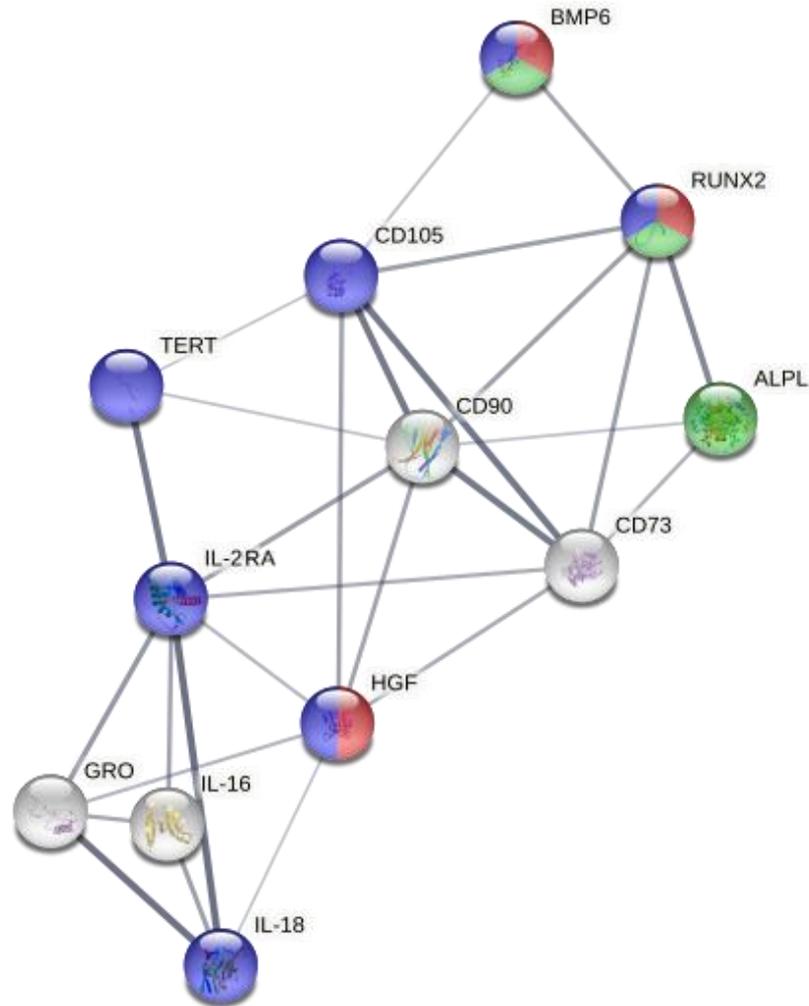


Рисунок 19. Функциональные прерогативы сети межмолекулярных взаимодействий. Синим цветом отмечены факторы позитивной регуляции клеточной дифференцировки; красным - факторы, напрямую участвующие в дифференцировке и созревании остеобластов; зеленым - позитивные факторы функций остеобластов. Толщина линий свидетельствует о силе взаимосвязи.

Далее, в процессы хемотаксиса, клеточной пролиферации, локомоции и клеточной адгезии может быть вовлечено 11 из 12 анализируемых компонентов (рис.20).

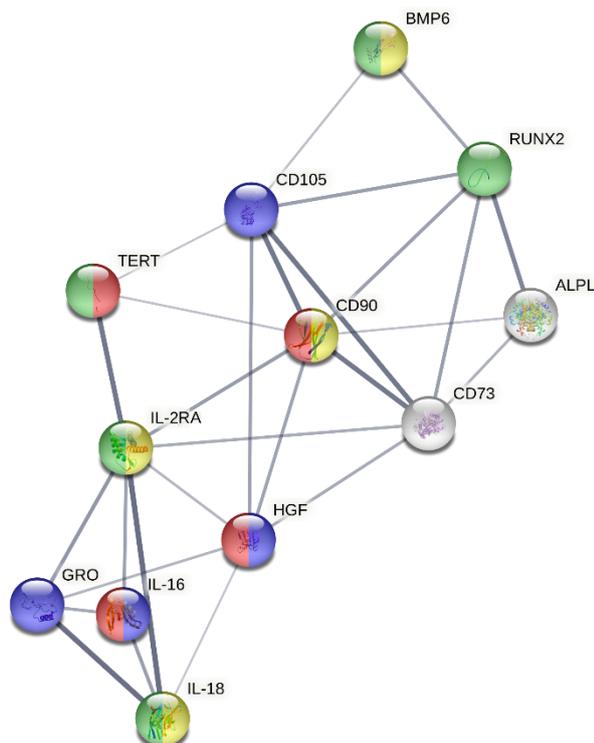


Рисунок 20. Функциональные prerogative (хемотаксис, локомоция, пролиферация, межклеточная адгезия) сети межмолекулярных взаимодействий. Синим цветом отмечены факторы, участвующие в клеточном хемотаксисе; красным - факторы регуляции локомоции; зеленым - факторы позитивной регуляции клеточной пролиферации; желтым - факторы регуляции межклеточной адгезии. Толщина линий свидетельствует о силе взаимосвязи.

Локомоторная активность способна снижаться за счет потери маркера CD90 (табл. 5), уменьшения уровня продукции HGF и IL16 (табл. 8). Выявленная в работе повышенная секреция факторов IL18, IL2Ra (табл. 8) и усиление экспрессии *BMP6* (табл. 9), согласно информационной базе данных, может свидетельствовать о процессах межклеточной адгезии. Снижение уровней CD105, HGF и IL-16 (табл. 5,8) может также свидетельствовать об окончании хемотаксиса/локомоции и перехода клеточной культуры к процессам остеодифференцировки.

Наряду с биоинформатическим анализом данных, была получена сеть реальных корреляционных взаимодействий на основании собственных экспериментов (рис. 21). Стоит отметить, что предсказанные взаимосвязи с помощью биоинформационного метода (рис.19-20) во многом схожи с экспериментальными взаимосвязями (рис.21).

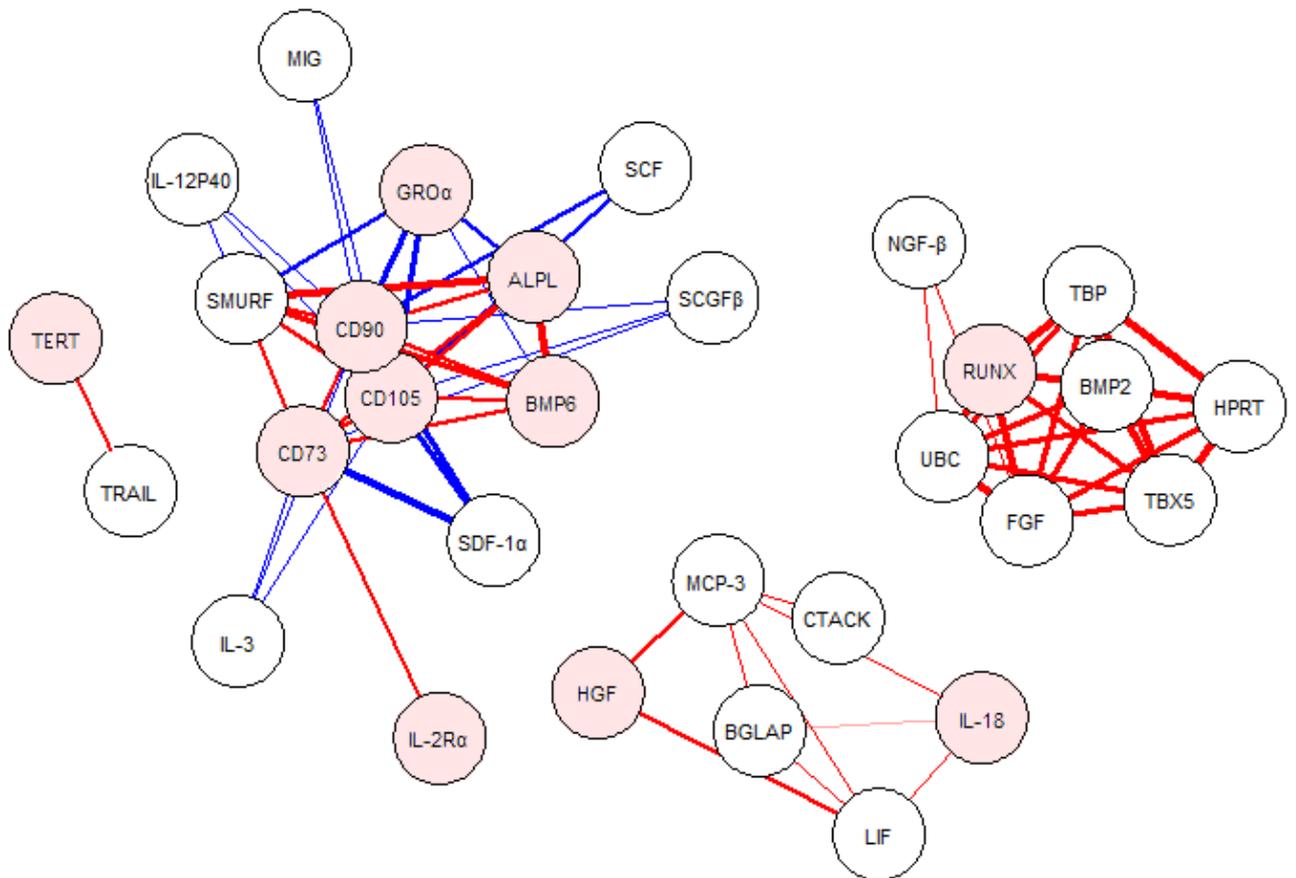


Рисунок 21 Схема корреляционных связей в 3D-модели культуры СКК человека. Красным выделены положительные, синим – отрицательные корреляции. Сила корреляционных взаимосвязей при $r > 0,6$ выделена шириной линии, соединяющей показатели.

Таким образом, из рис.19-21 следует, что к 14-м суткам в 3D культуре СКК жировой ткани человека формируется трехмерная сеть взаимодействующих плейотропных генов и биомолекул, характеризующих переход от процессов клеточной миграции и пролиферации к межклеточной адгезии и дифференцировке стволовых клеток в секретирующие остеобласты. К 21-м суткам наблюдения образуется минерализованный межклеточный матрикс, свидетельствующий о переходе разрозненных клеточных популяций к прототипу культуры костной ткани *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С точки зрения физиологической интерпретации полученных данных, ССК жировой ткани человека в стандартной двумерной 14-21-суточной *in vitro* культуре слабо экспрессируют гены остеобластов *RUNX2*, *BMP6* и *ALPL*, сохраняют маркеры стволовости (CD90, 73, 105), активно мигрируют и пролиферируют, но не формируют минерализованный межклеточный матрикс. В 3D культурах ССК жировой ткани человека при прямом контакте с модельными образцами, имитирующими минеральное вещество регенерирующей костной ткани, мигрируют с КФ покрытия и активно заселяют пластиковую поверхность лунок планшетов; при этом культура стволовых клеток на образцах с КФ покрытием и вокруг них претерпевает морфофункциональные изменения, соответствующие выраженной дифференцировке и созреванию в остеобласты.

Основные механизмы остеогенной активности ССК жировой ткани человека в трехмерной *in vitro* модели регенерации костной ткани включают высвобождение ионов кальция и фосфора и эмиграцию стромальных стволовых клеток с растворимой кальцийфосфатной поверхности, формирование трехмерной сети регуляторных цитокинов/хемокинов. Межмолекулярный сигналинг между плейотропными цитокинами/хемокинами и генами остеодифференцировки приводит к 14-м суткам к активации ранних генов остеодифференцировки (*RUNX2*, *BMP6*, *ALPL*). Как следствие, к 21-м суткам наблюдения образуется минерализованный межклеточный матрикс, свидетельствующий о переходе разрозненных клеточных популяций к прототипу трехмерной культуры костной ткани *in vitro*.

Полученные данные могут послужить основой для расшифровки механизмов остеоинтеграции изделий с разнообразными КФ покрытиями, выявления сферы их применения при реконструкции костной ткани в области ортопедии и травматологии, челюстно-лицевой хирургии, дентальной имплантологии.

ВЫВОДЫ

1. Адгезирующие фибробластоподобные стромальные стволовые клетки (ССК), выделенные из жировой ткани человека, в стандартной (двумерной) 14-21-суточной *in vitro* культуре на пластиковой поверхности сохраняют маркеры стволовости (CD73, CD90 и CD105), слабо экспрессируют мРНК остеогенных генов *RUNX2*, *BMP6* и *ALPL*, активно мигрируют и пролиферируют, но не формируют минерализованный межклеточный матрикс, характерный для культур остеобластов.

2. Трехмерное *in vitro* моделирование регенерации костной ткани с помощью биосовместимых образцов с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральное вещество кости, способствует эмиграции ССК с кальцийфосфатной поверхности, заселению 30 % свободной территории вокруг образцов, индукции дифференцировки и созревания в остеобласты.

3. ССК жировой ткани человека в трехмерной *in vitro* модели претерпевают на пластике существенную морфофункциональную трансформацию (в сравнении со стандартной культурой клеток на пластике), характеризующую их дифференцировку и созревание в остеобласты: снижение активности процессов миграции и инвазии; уменьшение числа клеточных делений; падение экспрессии маркеров стволовости (CD73, CD90 и CD105) и рост презентации антигенов гемопоэтических клеток (CD 14, CD 20, CD 34, CD 45); повышение экспрессии мРНК остеогенных генов *RUNX2*, *BMP6* и *ALPL*; изменение секреторного профиля клеток (IL-2R α , IL-16, IL-18, HGF, GRO α); формирование кальцифицированного межклеточного матрикса.

4. Гуморальные механизмы *in vitro* формирования на пластике минерализованного 3D-прототипа костной ткани включают высвобождение ионов кальция и фосфора и формирование трехмерной сети остеомодулирующих цитокинов/хемокинов.

Список литературы

1. Авантдилов Г. Г. Диагностическая медицинская плоидометрия: учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей. Москва: , 2006. Вып. Медицина. 191 с.
2. Биоконпозиты на основе кальций-фосфатных покpытий, наноструктурных и ультрамелкозернистых биоинертных металлов, их биосовместимость и биодеградация / Ю.П. Шаркеев, С.Г. Псахье, Е.В. Легостаева и др. – Томск : Издательский Дом Томского государственного университета, 2014. – 596 с.
3. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / В.В. Новицкий, В.П. Шахов, И.А. Хлусов. – Томск : STT, 2004. – 386 с.
4. Кремер Н. Ш. Практикум по высшей математике для экономистов / Н. Ш. Кремер // Учебное пособие для вузов. – 2004.
5. Мелашенко Е.С. Клеточно-молекулярные реакции иммунокомпетентных клеток в трехмерной культуре.: автореф... дис. кан. биол. наук. – Томск.: 2020. – 23 с.
6. Ниши стволовых клеток и регенеративная медицина / А.В. Васильев, Е.А. Воротеяк, В.В. Терских //Российский физиологический журнал. – 2016, – V. 102, №3. – P. 241-261.
7. Риггз, Б Остеопороз. Этиология, диагностика, лечение. / Б Риггз, Ш Мелтон, Л. Джозеф. – Санкт-Петербург : Невский диалект. 2000. – 560 с.
8. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro / J.M. Quinn, J. Elliott, M.T. Gillespie et al.// Endocrinology. – 1998, – V. 139, №10. – P. 4424-4427.
9. A degradable soybean-based biomaterial used effectively as a bone filler in vivo in a rabbit / A. Merolli, L. Nicolais, L. Ambrosio et al.// Biomedical Materials (Bristol, England). – 2010, – V. 5, №1. – P. 15008.

10. A Novel Monoclonal Antibody (STRO-3) Identifies an Isoform of Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Expressed by Multipotent Bone Marrow Stromal Stem Cells / S. Gronthos, S. Fitter, P. Diamond et al.// *Stem cells and development*. – 2008, – V. 16, – P. 953-963.
11. A polycaprolactone/cuttlefish bone-derived hydroxyapatite composite porous scaffold for bone tissue engineering / B.-S. Kim, S.-S. Yang, J. Lee // *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. – 2014, – V. 102, №5. – P. 943-951.
12. A three-dimensional porous hydroxyapatite nanocomposite scaffold with shape memory effect for bone tissue engineering / J. Yu, H. Xia, Q.-Q. Ni // *Journal of Materials Science*. – 2018, – V. 53, №7. – P. 4734-4744.
13. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca²⁺- and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts / L. Dawei, G.C. Damian, Y. Shao et al.// *Bone*. – 2008, – V. 42, №4. – P. 644-652.
14. Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation / S. Chen, M. Lewallen, T. Xie // *Development*. – 2013, – V. 140, №2. – P. 255-265.
15. Adiponectin promotes human jaw bone marrow mesenchymal stem cell chemotaxis via CXCL1 and CXCL8 / Y. Pu, M. Wang, Y. Hong et al.// *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2017, – V. 21, №7. – P. 1411-1419.
16. Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair / C.R. Fellows, C. Matta, R. Zakany et al.// *Frontiers in Genetics*. – 2016, – V. 7, №213
17. Adsorption of fibronectin, fibrinogen, and albumin on TiO₂: time-resolved kinetics, structural changes, and competition study/ M. Pegueroles, C. Tonda-Turo, J.A. Planell et al.// *Biointerphases*. – 2012, – V. 7, №1-4. – P. 48.
18. Albrektsson, T. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration / T. Albrektsson, C. Johansson // *European Spine Journal*. – 2001, – V. 10, №2. – P. 96-101.

19. Ambard, A. J. Calcium Phosphate Cement: Review of Mechanical and Biological Properties / A.J. Ambard, L. Mueninghoff // *Calcium Phosphate Cement*. – 2006, – V. 15, №5. – P. 321-328.
20. An in vitro study demonstrating that haematomas found at the site of human fractures contain progenitor cells with multilineage capacity / K. Oe, M. Miwa, Y. Sakai et al.// *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*. – 2007, – V. 89, №1. – P. 133-138.
21. Application of digital design and three-dimensional printing technique on individualized medical treatment / M. Qin, Y. Liu, J. He et al.// *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*. – 2014, – V. 28, №3. – P. 286-291.
22. Asagiri, M. The molecular understanding of osteoclast differentiation / M. Asagiri, H. Takayanagi // *Bone*. – 2007, – V. 40, №2. – P. 251-264.
23. Ayoub, A. Biomaterials in the Reconstruction of the Oral and Maxillofacial Region/ A. Ayoub, R. Al-Fotawei // *Frontiers of Oral Biology*. – 2015, – V. 17, P. 101-114.
24. Bellido, T. Osteocyte-driven bone remodeling / T. Bellido // *Calcif. Tissue Int*. – 2014. – Vol. 94. – P. 25–34.
25. Betz, R.R. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions / R.R. Betz // *Orthopedics*. – 2002, – V. 25, №5. – P. 561-570.
26. Bioactive Micro-arc Calcium Phosphate Coatings on Nanostructured and Ultrafine-Grained Bioinert Metals and Alloys / Editor I. Antoniac / Y. Sharkeev, E. Komarova, M. Sedelnikova et al // *Bioceramics and Biocomposites: From Research to Clinical Practice*., Chapter 8. Willey. – 2006. – P. 191-231
27. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration / D. Tang, R.S. Tare, L.-Y. Yang et al.// *Biomaterials*. – 2016, – V. 83, – P. 363-382.
28. Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering / Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini // *Biomaterials*. – 2006, – V. 27, №11. – P. 2414-2425.

29. Biology of implant osseointegration / A.F. Mavrogenis, R. Dimitriou, J. Parvizi et al.// *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. – 2009, – V. 9, №2. – P. 61-71.
30. Biomaterials for craniofacial bone engineering / R. Tevlin, A. McArdle, D. Atashroo et al.// *Journal of Dental Research*. – 2014, – V. 91, №12. – P. 1187-1195.
31. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine / B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons. – Amsterdam; Boston : Elsevier Academic Press, 2004. – 864 p.
32. Biopolymers as bone substitutes: a review / A. Kashirina, Y. Yao, Y. Liu et al.// *Biomaterials Science*. – 2019, – V. 7, №10. – P. 3961-3983.
33. Bioprinted osteon-like scaffolds enhance in vivo neovascularization / C. Piard, H. Baker, T. Kamalidinov et al.// *Biofabrication*. – 2019, – V. 11, №2. – P. 1-18.
34. Bone lining cells: structure and function / S. C. Miller, L. de Saint-Georges, B. M. Bowman et al.// *Scanning Microscopy*. – 1989, – V. 3, №3. – P. 953-960.
35. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells / S. Glennie, I. Soeiro, P.J. Dyson et al.// *Blood*. – 2005, – V. 105, №7. – P. 2821-2827.
36. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells / N. He, L. Zhang, J. Cui et al.// *Bone Marrow Research*. – 2014, – V. 2014, – P. 128436.
37. Bone mesenchymal stem cell secretion of sRANKL/OPG/M-CSF in response to macrophage-mediated inflammatory response influences osteogenesis on nanostructured Ti surfaces / Q.-L. Ma, L. Fang, N. Jiang et al.// *Biomaterials*. – 2018, – V. 154, – P. 234-247.
38. Bone remodeling: A tissue-level process emerging from cell-level molecular algorithms / C.F. Arias, M.A. Herrero, L.F. Echeverri et al.// *PLoS ONE*. Bone remodeling. – 2018, – V. 13, №9. – P. 1-19.
39. Bonewald, L.F. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells / L.F. Bonewald // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2007, – V. 1116, №1. – P. 281-290.
40. Bonewald, L.F. The amazing osteocyte / L.F. Bonewald // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2011, – V. 26, №2. – P. 229-238.

41. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis / K. Schmidt-Bleek, B.J. Kwee, D.J. Mooney, G.N. Duda // *Tissue Engineering. Part B. Reviews.* – 2015. – V. 21, №4. – P. 354-364.
42. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior / S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein // *Acta Biomaterialia.* – 2013, – V. 9, №9. – P. 8037-8045.
43. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling / Y.-R.V. Shih, Y.S. Hwang, A. Phadke et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2014, – V. 111, №3. – P. 990-995.
44. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts / T.E. Danciu, R.M. Adam, K. Naruse et al. // *FEBS Letters.* – 2003, – V. 536, №1-3. – P. 193-197.
45. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells as trophic mediators / A.I. Caplan, J.E. Dennis // *Journal of Cellular Biochemistry.* – 2006, – V. 98, №5. – P. 1076-1084.
46. CD146 Expression Influences Periapical Cyst Mesenchymal Stem Cell Properties / F. Paduano, M. Marrelli, F. Palmieri et al. // *Stem Cell Reviews and Reports.* – 2016, – V. 12, №5. – P. 592-603.
47. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture / M. Álvarez-Viejo, Y. Menéndez-Menéndez, J. Otero-Hernández // *World Journal of Stem Cells.* – 2015, – V. 7, №2. – P. 470-476.
48. CD73, CD90, CD105 and Cadherin-11 RT-PCR Screening for Mesenchymal Stem Cells from Cryopreserved Human Cord Tissue / H. Pham, R. Tonai, M. Wu et al. // *International Journal of Stem Cells.* – 2018, – V. 11, №1. – P. 26-28.
49. Characteristics of contact and distance osteogenesis around modified implant surfaces in rabbit tibiae / J.-Y. Choi, J.-H. Sim, I.-S. L. Yeo // *Journal of Periodontal & Implant Science.* – 2017, – V. 47, №3. – P. 182-192.
50. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration application / Z. Sheikh, J. Qureshi, A.M. Alshahrani et al. // *Odontology.* – 2017, – V. 105, №1. – P. 1-12.

51. Combes, C. Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials / C. Combes, C. Rey // *Acta Biomaterialia*. – 2010, – V. 6, №9. – P. 3362-3378.
52. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats / P. S. Cerri, F. Boabaid, E. Katchburian // *Journal of Periodontal Research*. – 2003, – V. 38, №2. – P. 223-226.
53. Currey, J.D. How Well Are Bones Designed to Resist Fracture? / J.D. Currey // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2003, – V. 18, №4. – P. 591-598.
54. Davies, J.E. In vitro modeling of the bone/implant interface / J.E. Davies // *The Anatomical Record*. – 1996, – V. 245, №2. – P. 426-445.
55. Davies, J.E. Understanding peri-implant endosseous healing / J.E. Davies // *Journal of Dental Education*. – 2003, – V. 67, №8. – P. 932-949.
56. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants / T. Berglundh, I. Abrahamsson, N.P. Lang et al.// *Clinical Oral Implants Research*. – 2003, – V. 14, №3. – P. 251-262.
57. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats / A. P. S. Faloni, E. Sasso-Cerri, E. Katchburian et al.// *Journal of Periodontal Research*. – 2007, – V. 42, №3. – P. 193-201.
58. Design and optimization of the oriented groove on the hip implant surface to promote bone microstructure integrity / Y. Noyama, T. Nakano, T. Ishimoto et al.// *Bone*. – 2013, – V. 52, №2. – P. 659-667.
59. Designing optimal calcium phosphate scaffold–cell combinations using an integrative model-based approach / A. Carlier, Y.C. Chai, M. Moesen et al.// *Acta Biomaterialia*. – 2011, – V. 7, №10. – P. 3573-3585.
60. Development of methods for studying the differentiation of human mesenchymal stem cells under cyclic compressive strain / E. Michalopoulos, R.L. Knight, S. Korossis et al.// *Tissue Engineering. Part C*. – 2012, – V. 18, №4. – P. 252-262.

61. Development of novel three-dimensional printed scaffolds for osteochondral regeneration / B. Holmes, W. Zhu, J. Li et al.// *Tissue Engineering. Part A.* – 2015, – V. 21, №1-2. – P. 403-415.
62. Differential response of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, dermal fibroblasts, and keratinocytes to burn wound exudates: potential role of skin-specific chemokine CCL27/ L.J. Broek, K.L. Kroeze, T. Waaijman et al.// *Tissue Engineering. Part A.* – 2014, – V. 20, №1-2. – P. 197-209.
63. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone / A.E. Grigoriadis, J.N. Heersche, J.E. Aubin // *The Journal of Cell Biology.* – 1988, – V. 106, №6. – P. 2139-2151.
64. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? / G.-I. Im, Y.-W. Shin, K.-B. Lee // *Osteoarthritis and Cartilage.* – 2005, – V. 13, №10. – P. 845-853.
65. Doblaré, M. Modelling bone tissue fracture and healing: a review / M. Doblaré, J. M. García, M. J. Gómez // *Eng. Fract. Mech.* – 2004. – Vol. 71. – P. 1809–1840.
66. Dorozhkin, S. V. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates / S.V. Dorozhkin, M. Epple // *Angewandte Chemie International Edition.* – 2002, – V. 41, №17. – P. 3130-3146.
67. Dorozhkin, S.V. Calcium orthophosphates / S.V. Dorozhkin // *Journal of Materials Science.* – 2007, – V. 42, №4. – P. 1061-1095.
68. Dvorak, M. M. Ca²⁺ as an extracellular signal in bone / M.M. Dvorak, D. Riccardi // *Cell Calcium.* – 2004, – V. 35, №3. – P. 249-255
69. Early stages of bone fracture healing: formation of a fibrin-collagen scaffold in the fracture hematoma / L.F. Echeverri, M.A. Herrero, J.M. Lopez, G. Oleaga et al.// *Bulletin of Mathematical Biology.* – 2015, – V. 77, №1. – P. 156-183.

70. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells / Q. Hu, Z. Tan, Y. Liu et al.// *Journal of Materials Chemistry*. – 2007, – V. 17, №44. – P. 4690-4698.
71. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption / X.D. Zhu, H.J. Zhang, H.S. Fan et al.// *Acta Biomaterialia*. – 2010, – V. 6, №4. – P. 1536-1541.
72. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength / D.D Deligianni, N.D Katsala, P.G Koutsoukoet al.// *Biomaterials*. – 2000, – V. 22, №1. – P. 87-96.
73. Einhorn, T. A. Fracture healing: mechanisms and interventions / T. A. Einhorn, L. C. Gerstenfeld // *Nature Reviews. Rheumatology. Fracture healing* –2015.–V. 11, №1. – P. 45-54.
74. Einhorn, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing / T.A. Einhorn // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 1998, – V. 355, – P. 7-21.
75. Endogenous musculoskeletal tissue regeneration / D.W. Hutmacher, G. Duda, R.E. Guldberg // *Cell and Tissue Research*. – 2012, – V. 347, №3. – P. 485-488.
76. English, K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation / K. English // *Immunology and Cell Biology*. – 2013, – V. 91, №1. – P. 19-26.
77. Enhanced in vitro osteogenic differentiation of human fetal MSCs attached to 3D microcarriers versus harvested from 2D monolayers / A. Shekaran, E. Sim, K.Y. Tan et al.// *BMC Biotechnology*. – 2015, – V. 15, №1. – P. 102.
78. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression / T. Nakashima, M. Hayashi, T. Fukunaga et al.// *Nature Medicine*. – 2011, – V. 17, №10. – P. 1231-1234.
79. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease / P. Lu, K. Takai, V.M. Weaver et al.// *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2011, – V. 3, №12. – P. 1-25.

80. Extracellular matrix networks in bone remodeling / A.I. Alford, K.M. Kozloff, K.D. Hankenson // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2015, – V. 65, – P. 20-31.
81. Fabrication of nanocrystalline hydroxyapatite doped degradable composite hollow fiber for guided and biomimetic bone tissue engineering: Next Generation Biomaterials / N. Zhang, H.L. Nichols, S. Tylor et al.// *Materials Science and Engineering: C*. – 2007, – V. 27, №3. – P. 599-606.
82. FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling / U. Sobhan, M. Li, S. Sultana et al.// *Journal of electron microscopy*. – 2009, – V. 58, №6. – P. 381-392.
83. Fibronectin and vitronectin promote human fetal osteoblast cell attachment and proliferation on nanoporous titanium surfaces / D.M. Rivera-Chacon, M. Alvarado-Velez, C.Y. Acevedo-Morantes et al.// *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2013, – V. 9, №6. – P. 1092-1097.
84. Fragility of Bone Material Controlled by Internal Interfaces / W. Wagermaier, K. Klaushofer, P. Fratzl // *Calcified Tissue International*. – 2015, – V. 97, №3. – P. 201-212.
85. Functional heterogeneity of osteocytes in FGF23 production: the possible involvement of DMP1 as a direct negative regulator / J.-W. Lee, A. Yamaguchi, T. Iimura // *BoneKEY Reports*. – 2014, – V. 3, №543. – P. 1-10.
86. Garnero, P. The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone / P. Garnero // *Calcified Tissue International*. – 2015, – V. 97, №3. – P. 229-240.
87. Group III metabotropic glutamate receptor activation inhibits Ca²⁺ influx and nitric oxide synthase activity in bone marrow stromal cells / M.A. Foreman, Y. Gu, J.D. Howl et al.// *Journal of Cellular Physiology*. – 2005, – V. 204, №2. – P. 704-713.
88. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells / D.E. Discher, D.J. Mooney, P.W. Zandstr// *Science*. – 2009, – V. 324, №5935. – P. 1673-1677.

89. Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis / B. Wessing, S. Lettner, W. Zechner // *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.* – 2018, – V. 33, №1. – P. 87-100.
90. Guntur, A.R. Bone as an Endocrine Organ / A.R Guntur, C.J Rosen // *Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists.* – 2012, – V. 18, №5. – P. 758-762.
91. Guo, D. Advancing Our Understanding of Osteocyte Cell Biology / D. Guo, L.F. Bonewald // *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease.* – 2009, – V. 1, №2. – P. 87-96.
92. Gurkan, U.A. The Mechanical Environment of Bone Marrow: A Review / U.A. Gurkan, O. Akkus // *Annals of Biomedical Engineering.* – 2008, – V. 36, №12. – P. 1978-1991.
93. Hall, B. K. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development / B. K. Hall, T. Miyake // *Bioessays.* – 2000. – Vol. 22. – P. 138–147.
94. Harada, S. Control of osteoblast function and regulation of bone mass / S. Harada, G. A. Rodan // *Nature.* – 2003. – Vol. 423. – P. 349–355.
95. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro / D. Jing, A.-V. Fonseca, N. Alakel et al.// *Haematologica.* – 2010, – V. 95, №4. – P. 542-550.
96. Hepatocyte growth factor improves bone regeneration via the bone morphogenetic protein-2-mediated NF- κ B signaling pathway / R. Zhen, J. Yang, Y. Wang et al.// *Molecular Medicine Reports.* – 2018, – V. 17, №4. – P. 6045-6053.
97. High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK–RANKL signaling in osteoclast-like cells / A. Mozar, N. Haren, M. Chasseraud et al.// *Journal of Cellular Physiology.* – 2008, – V. 215, №1. – P. 47-54.
98. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure / G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland et al.// *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* – 2005, – V. 74A, №1. – P. 49-58.

99. How osteoblasts become osteocytes / T.A. Franz-Odenaal, B.K. Hall, P.E. Witten // *Developmental Dynamics*. – 2006, – V. 235, №1. – P. 176-190.
100. Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo / S.M. Phadnis, M.V. Joglekar, M.P. Dalvi et al.// *Cytotherapy*. – 2011, – V. 13, №3. – P. 279-293.
101. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia / P. Kolar, T. Gaber, C. Perka et al.// *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2011, – V. 469, №11. – P. 3118-3126.
102. Human pluripotent stem cell (PSC)-derived mesenchymal stem cells (MSCs) show potent neurogenic capacity which is enhanced with cytoskeletal rearrangement / K.-Y. Peng, Y.-W. Lee, P.-J. Hsu et al.// *Oncotarget*. – 2016, – V. 7, №28. – P. 43949-43959.
103. Hypoxic osteocytes recruit human MSCs through an OPN/CD44-mediated pathway / L.F. Raheja, D.C. Genetos, C.E. Yellowley // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2008, – V. 366, №4. – P. 1061-1066.
104. Immune Modulation by Transplanted Calcium Phosphate Biomaterials and Human Mesenchymal Stromal Cells in Bone Regeneration / P. Humbert, M.Á. Brennan, N. Davison et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2019, – Vol. 10, – P. 663.
105. Immunological characterization of the early human fracture hematoma / P. Hoff, T. Gaber, C. Strehl, K. Schmidt-Bleek et al. // *Immunologic Research*, – 2016, V. 64, №. 5-6. – P. 1195-1206.
106. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants / R.A. Gittens, R. Olivares-Navarrete, Z. Schwartz et al.// *Acta Biomaterialia*. – 2014, – V. 10, №8. – P. 3363-3371.
107. Implant Surface Design Regulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Maturation / B.D. Boyan, A. Cheng, R. Olivares-Navarrete et al.// *Advances in Dental Research*. – 2016, – V. 28, №1. – P. 10-17.

108. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone / C. Eriksson, H. Nygren, K. Ohlson // *Biomaterials*. – 2004, – V. 25, №19. – P. 4759-4766.
109. In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis / A.M. Pino, C.J. Rosen, J.P. Rodríguez // *Biological Research*. – 2012, – V. 45, №3. – P. 279-287.
110. In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation / N. Datta, Q.P. Pham, U. Sharma et al.// *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2006, – V. 103, №8. – P. 2488-2493.
111. Inflammation, fracture and bone repair / F. Loi, L.A. Córdova, J. Pajarinen et al.// *Bone*. – 2016, – V. 86, – P. 119-130.
112. Influence of inflammatory conditions provided by macrophages on osteogenic ability of mesenchymal stem cells / G. Vallés, F. Bensiamar, L. Maestro-Paramio et al.// *Stem Cell Research & Therapy*. – 2020, – V. 11, №1. – P. 57.
113. Inhibition of Rac and ROCK Signalling Influence Osteoblast Adhesion, Differentiation and Mineralization on Titanium Topographies / P.D.H. Prowse, C.G. Elliott, J. Hutter et al.// *PLOS ONE*. – 2013, – V. 8, №3. – P. 588-598.
114. Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing / K. Schmidt-Bleek, H. Schell, J. Lienau et al.// *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2014, – V. 8, №2. – P. 120-130.
115. Interleukin-18 is a novel mitogen of osteogenic and chondrogenic cells / J. Cornish, M.T. Gillespie, K.E. Callon et al.// *Endocrinology*. – 2003, – V. 144, №4. – P. 1194-1201.
116. Is efficacy optimal in a narrow dose range? / M.M. Kabat, I. Bobkov, S. Kumar et al.// *Stem Cells Translational Medicine*. – 2020, – V. 9, №1. – P. 17-27.
117. Isolation and Localization of Mesenchymal Stem Cells in Human Palatine Tonsil by W5C5 (SUSD2) / B.-J. Lee, D.-W. Kang, H.-Y. Park et al.// *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2016, – V. 38, №1. – P. 83-93.

118. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1 / V.L. Battula, S. Treml, P.M. Bareiss et al.// *Haematologica*. – 2009, – V. 94, №2. – P. 173-184.
119. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta / S.A. Pieternella, A.S. Sicco, C.K. Keur et al.// *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. – 2004, – V. 22, №7. – P. 1338-1345.
120. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2/ T. Komori // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2010, – V. 658, – P. 43-49.
121. Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate / H. M. Kronenberg // *Nature*. – 2003. – Vol. 423. – P. 332–336.
122. Kübler, N.R. Osteoinduktion und- reparation/ N.R. Kübler // *Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2013, – V. 2, №25. – P. 2-25.
123. Ladoux B. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues / B. Ladoux, A. Nicolas // *Reports on Progress in Physics. Physical Society*. – 2012, – V. 75, №11. – P. 116601.
124. Leitinger, B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions / B. Leitinger // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2014, – V. 310, – P. 39-87.
125. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression / A. Nasef, C. Mazurier, S. Bouchet et al.// *Cellular Immunology*. – 2008, – V. 253, №1. – P. 16-22.
126. Liao H.-T. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells / H.-T. Liao // *World Journal of Stem Cells*. – 2014, – V. 6, №3. – P. 288.
127. Lieberman J.R., Friedlaender G.E. Springer; 2005. Chapter I. Bone Dynamics, Bone Regeneration and Repair; p. 1.

128. Lindsay S.L. Are nestin-positive mesenchymal stromal cells a better source of cells for CNS repair?/ S.L. Lindsay, S.C. Barnett // *Neurochemistry International*. – 2017, – V. 106, – P. 101-107.
129. Long-term sustained release of salicylic acid from cross-linked biodegradable polyester induces a reduced foreign body response in mice / Y. Chandorkar, N. Bhaskar, G. Madras et al.// *Biomacromolecules*. – 2015, – V. 16, №2. – P. 636-649.
130. Low temperature additive manufacturing of three dimensional scaffolds for bone-tissue engineering applications: Processing related challenges and property assessment / A. Kumar, S. Mandal, S. Barui et al.// *Materials Science and Engineering: R: Reports*. – 2016, – V. 103, – P. 1-39.
131. Ma, X.-F. Development of bone tissue engineering scaffold materials / X.-F. Ma, J.-Y. Zhang // *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*. – 2014, – V. 18, №30. – P. 4895-4899.
132. Manolagas, S. Choreography from the Tomb: An Emerging Role of Dying Osteocytes in the Purposeful, and Perhaps Not So Purposeful, Targeting of Bone Remodeling / S. Manolagas // *International Bone and Mineral Society Knowledge Environment*. – 2006, – V. 3, – P. 5-14.
133. Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration / Z. Ge, Z. Jin, T. Cao // *Biomedical Materials*. – 2008, – V. 3, №2. – P. 1-11.
134. Manufacture of β -TCP/alginate scaffolds through a Fab@home model for application in bone tissue engineering / G.S. Diogo, V.M. Gaspar, I.R. Serra et al.// *Biofabrication*. – 2014, – V. 6, №2. – P. 1-12.
135. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation / R.C. Riddle, A.F. Taylor, D.C. Genetos et al.// *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2006, – V. 290, №3. – P. 776-784.
136. Marie, P. J. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets / P. J. Marie, M. Kassem // *Eur. J. Endocrinol*. – 2011. – Vol. 165. – P. 1–10.

137. Marks, S.C. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton / S.C. Marks, S.N. Popoff // *The American Journal of Anatomy*. – 1988, – V. 183, №1. – P. 1-44.
138. Marrow adipocyte-derived CXCL1 and CXCL2 contribute to osteolysis in metastatic prostate cancer / A.L. Hardaway, M.K. Herroon, E. Rajagurubandara et al.// *Clinical & Experimental Metastasis*. – 2015, – V. 32, №4. – P. 353-368.
139. Marx, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use / R.E. Marx // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2004, – V. 62, №4. – P. 489-496.
140. Mathieu, P.S. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways / P.S. Mathieu, E.G. Lobo // *Tissue Engineering. Part B*. – 2012, – V. 18, №6. – P. 436-444.
141. Matrix-embedded cells control osteoclast formation / J. Xiong, M. Onal, R.L. Jilka et al.// *Nature Medicine*. – 2011, – V. 17, №10. – P. 1235-1241.
142. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: Perspective into mechanical induction of MSC fate / J. Hao, Y. Zhang, D. Jing et al.// *Acta Biomaterialia*. – 2015, – V. 20, – P. 1-9.
143. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite type structure / M. V. Chaikina, N. F. Uvarov, A. S. Ulihin et al. // *Problems of Materials Science*. – 2008. – Vol. 2, № 54. – P. 219–232.
144. Merolli, A. Role of phosphatidyl-serine in bone repair and its technological exploitation / A. Merolli, M. Santin // *Molecules*. – 2009. – Vol. 14, № 12. – P. 5367–5381.
145. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche / S. Méndez-Ferrer, T.V. Michurina, F. Ferraro et al.// *Nature*. – 2010, – V. 466, №7308. – P. 829-834.
146. *Mesenchymal Stem Cell Engineering and Transplantation* / F. Aerts, G. Wageman // *Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells, Chapter 1*. Springer. – 2006. – P. 1-44

147. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds / T. Mygind, M. Stiehler, A. Baatrup et al.// *Biomaterials*. – 2007, – V. 28, №6. – P. 1036-1047.
148. Mesenchymal Stem Cell Marker Stro-1 is a 75kd Endothelial Antigen / H. Ning, G. Lin, T.F. Lue et al.// *Biochemical and biophysical research communications*. – 2011, – V. 413, №2. – P. 353-357.
149. Mesenchymal stromal cells: a key player in ‘innate tolerance’? / F. Dazzi, L. Lopes, L. Weng // *Immunology*. – 2012, – V. 137, №3. – P. 206-213.
150. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al.// *Cytotherapy*. – 2006, – V. 8, №4. – P. 315-317.
151. Minkin, C. Role of the osteoclast at the bone-implant interface / C. Minkin, V.C. Marinho // *Advances in Dental Research*. – 1999, – V. 13, – P. 49-56.
152. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling / V. Lemaire, F.L. Tobin, L.D. Greller et al.// *Journal of Theoretical Biology*. – 2004, – V. 229, №3. – P. 293-309.
153. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration / S.W. Lane, D.A. Williams, F.M. Watt // *Nature Biotechnology*. – 2014, – V. 32, №8. – P. 795-803.
154. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts / M. Fakhry, E. Hamade, B. Badran et al.// *World Journal of Stem Cells*. – 2013, – V. 5, №4. – P. 136-148.
155. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor / S. Schenk, N. Mal, A. Finan et al.// *Stem Cells*. – 2007, – V. 25, №1. – P. 245-251.
156. mTORC2 regulates mechanically induced cytoskeletal reorganization and lineage selection in marrow derived mesenchymal stem cells / B. Sen, Z. Xie, N. Case et al.// *Journal of bone and mineral research*. – 2014, – V. 29, №1. – P. 1-23.

157. Multifunctional Properties of Multistage Spark Plasma Sintered HA–BaTiO₃-Based Piezobiocomposites for Bone Replacement Applications / A.K. Dubey, A. Ea, K. Bal et al.// *Journal of the American Ceramic Society*. – 2013, – V. 96, №12. – P. 3753-3759.
158. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno et al.// *Tissue Engineering*. – 2001, – V. 7, №2. – P. 211-228.
159. Murr, L.E. Strategies for creating living, additively manufactured, open-cellular metal and alloy implants by promoting osseointegration, osteoinduction and vascularization: An overview / L.E. Murr // *Journal of Materials Science & Technology*. – 2019. – V. 35, №2. – P. 231-241.
160. Murshid, S.A. The role of osteocytes during experimental orthodontic tooth movement: A review / S.A. Murshid// *Archives of Oral Biology*. – 2017, – V. 73, – P. 25-33.
161. Nanoscale Electrical Potential and Roughness of a Calcium Phosphate Surface Promotes the Osteogenic Phenotype of Stromal Cells / I.A. Khlusov, Y. Dekhtyar, Y.P. Sharkeev et al.// *Materials*. – 2018, – V. 11, №6. – P. 978.
162. On the toughness enhancement in hydroxyapatite-based composites / A. Kumar, K. Biswas, B. Basu // *Acta Materialia*. – 2013, – V. 61, №14. – P. 5198-5215.
163. Orimo, H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease / H. Orimo// *Journal of Nippon Medical School*. – 2010, – V. 77, №1. – P. 4-12.
164. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation / P. Ducy, R. Zhang, V. Geoffroy, A.L. Ridall et al.// *Cell*. – 1997, – V. 89, №5. – P. 747-754.
165. Osseointegration--communication of cells / H. Terheyden, N.P. Lang, S. Bierbaum et al.// *Clinical Oral Implants Research*. – 2012, – V. 23, №10. – P. 1127-1135.
166. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers / M. Capulli, R. Paone, N. Rucci // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014, – V. 561, – P. 3-12.

167. Osteoblast response to zirconia-hybridized pyrophosphate-stabilized amorphous calcium phosphate / B.M. Whited, D. Skrtic, B.J. Love et al.// *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2006, – V. 76A, №3. – P. 596-604.
168. Osteoblast-like cells complete osteoclastic bone resorption and form new mineralized bone matrix in vitro / M.T.K. Mulari, Q. Qu, P.L. Härkönen et al.// *Calcified Tissue International*. – 2004, – V. 75, №3. – P. 253-261.
169. Osteoblast-like cellular response to dynamic changes in the ionic extracellular environment produced by calcium-deficient hydroxyapatite / J. Gustavsson, M.P. Ginebra, J. Planell et al.// *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2012, – V. 23, №10. – P. 2509-2520.
170. Osteoblasts induce Ca^{2+} oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis / Y. Kuroda, C. Hisatsune, T. Nakamura et al.// *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008, – V. 105, №25. – P. 8643-8648.
171. Osteocyte Apoptosis Is Induced by Weightlessness in Mice and Precedes Osteoclast Recruitment and Bone Loss / J.I. Aguirre, L.I. Plotkin, S.A. Stewart et al.// *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2006, – V. 21, №4. – P. 605-615.
172. Osteocyte apoptosis: The Osteocyte / R.L. Jilka, B. Noble, R.S. Weinstein // *Bone*. – 2013, – V. 54, №2. – P. 264-271.
173. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis / M.G. Mullender, D.D. Meer, R. Huiskes et al.// *Bone*. – 1996, – V. 18, №2. – P. 109-113.
174. Osteocyte Wnt/ β -Catenin Signaling Is Required for Normal Bone Homeostasis / I. Kramer, C. Halleux, H. Keller et al.// *Molecular and Cellular Biology*. – 2010, – V. 30, №12. – P. 3071-3085.
175. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue / G.Y. Rochefort, S. Pallu, C.L. Benhamou // *Osteoporosis International*. – 2010, – V. 21, №9. – P. 1457-1469.

176. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone / J. Xiong, M. Piemontese, M. Onal et al.// PLOS ONE. – 2015, – V. 10, №9. – P. 1-19.
177. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone / M.B. Schaffler, W.-Y. Cheung, R. Majeska et al.// Calcified Tissue International. – 2014, – V. 94, №1. – P. 5-24.
178. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism / M. C. Walsh, N. Kim, Y. Kadono et al. // Annu. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 24. – P. 33–63.
179. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting / H. Yuan, H. Fernandes, P. Habibovic et al.// Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010, – V. 107, №31. – P. 13614–13619.
180. Parrington, J. Ca(2+) signals, NAADP and two-pore channels: role in cellular differentiation / J. Parrington, R. Tunn // Acta Physiologica. – 2014, – V. 211, №2. – P. 285-296.
181. Peacock, M. Calcium Metabolism in Health and Disease / M. Peacock // Clinical Journal of the American Society of Nephrology. – 2010, – V. 5, №2. – P. 23-30.
182. Penido, M. G. Phosphate homeostasis and its role in bone health / M.G. Penido, U.S. Alon // Pediatric Nephrology. – 2012, – V. 27, №11. – P. 2039-2048.
183. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells / H. Tada, E. Nemoto, B.L. Foster et al.// Bone. – 2011, – V. 48, №6. – P. 1409-1416.
184. Phosphate-Dependent Regulation of MGP in Osteoblasts: Role of ERK1/2 and Fra-1 / M. Julien, S. Khoshniat, A. Lacreusette et al.// Journal of Bone and Mineral Research. – 2009, – V. 24, №11. – P. 1856-1868.
185. Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells / S. Sun, Y. Liu, S. Lipsky et al.// FASEB journal. – 2007, – V. 21, №7. – P. 1472-1480.

186. Physical, chemical and biological properties of micro-arc deposited calcium phosphate coatings on titanium and zirconium-niobium alloy / E.V. Legostaeva, K.S. Kulyashova, E.G. Komarova et al.// *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. – 2013, – V. 44, №2-3. – P. 188-197.
187. Physico-chemical characteristics and protein adsorption potential of hydroxyapatite particles: Influence on in vitro biocompatibility of ceramics after sintering / M. Rouahi, E. Champion, O. Gallet, A. Jada et al.// *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2006, – V. 47, №1. – P. 10-19.
188. Platelet-derived growth factor receptor beta identifies mesenchymal stem cells with enhanced engraftment to tissue injury and pro-angiogenic property / S. Wang, M. Mo, J. Wang et al.// *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2018, – V. 75, №3. – P. 547-561.
189. Plotkin, L.I. Apoptotic Osteocytes and the Control of Targeted Bone Resorption / L.I. Plotkin // *Current Osteoporosis Reports*. – 2014, – V. 12, №1. – P. 121-126.
190. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review / B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa et al.// *International Journal of Polymer Science*. – 2011, – V. 2011, – P. 1-19.
191. Porous scaffolds for bone regeneration / S. Hamlet, R.M. Love, N.-T. Nguyen // *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. – 2020, – V. 5, №1. – P. 1-9.
192. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds: Next Generation Biomaterials / E. Saiz, L. Gremillard, G. Menendez et al.// *Materials Science and Engineering: C*. – 2007, – V. 27, №3. – P. 546-550.
193. Proteomic analysis of human dental cementum and alveolar bone / C.R. Salmon, D.M. Tomazela, K.G.S. Ruiz et al.// *Journal of Proteomics*. – 2013, – V. 91, – P. 544-555.
194. Quarles, L.D. FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization / L.D. Quarles // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2003, – V. 285, №1. – P. 1-9.

195. Rapid biomimetic deposition of octacalcium phosphate coatings on zirconia ceramics (Y-TZP) for dental implant applications / M. Stefanic, K. Krnel, I. Pribosic et al.// *Applied Surface Science*. – 2012, – V. 258, №10. – P. 4649-4656.
196. Razzouk, S. Mesenchymal stem cells and their challenges for bone regeneration and osseointegration / S. Razzouk, R. Schoor // *Journal of Periodontology*. – 2012, – V. 83, №5. – P. 547-550.
197. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro / O. Frank, M. Heim, M. Jakob et al.// *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2002, – V. 85, №4. – P. 737-746.
198. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks / D.S. Amarasekara, S. Kim, J. Rho // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021, – V. 22, №6. – P. 28-51.
199. Role of implants surface modification in osseointegration: A systematic review / Y. Liu, B. Rath, M. Tingart et al.// *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2020, – V. 108, №3. – P. 470-484.
200. Role of surface charge and wettability on early stage mineralization and bone cell–materials interactions of polarized hydroxyapatite / S. Bodhak, S. Bose, A. Bandyopadhyay // *Acta Biomaterialia*. – 2009, – V. 5, №6. – P. 2178-2188.
201. Roughness and Hydrophilicity as Osteogenic Biomimetic Surface Properties / B.D. Boyan, E.M. Lotz, Z. Schwartz // *Tissue Engineering. Part A*. – 2017, – V. 23, №23-24. – P. 1479-1489.
202. Sakamoto, M. Development and evaluation of superporous hydroxyapatite ceramics with triple pore structure as bone tissue scaffold / M. Sakamoto // *Journal of the Ceramic Society of Japan*. – 2010, – V. 118, №1380. – P. 753-757.
203. Sapir-Koren, R. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption–formation cycles? / R. Sapir-Koren, G. Livshits // *Osteoporosis International*. – 2014, – V. 25, №12. – P. 2685-2700.

204. Schaffer, C.J. Cell biology of wound healing / C.J. Schaffer, L.B. Nanney // *International Review of Cytology*. – 1996, – V. 169, – P. 151-181.
205. Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism / G.J. Atkins, P.S. Rowe, H.P. Lim et al.// *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2011, – V. 26, №7. – P. 1425-1436.
206. Selection using the alpha-1 integrin (CD49a) enhances the multipotentiality of the mesenchymal stem cell population from heterogeneous bone marrow stromal cells / D.A. Rider, T. Nalathamby, V. Nurcombe et al.// *Journal of Molecular Histology*. – 2007, – V. 38, №5. – P. 449-458.
207. Selective protein adsorption property and characterization of nano-crystalline zinc-containing hydroxyapatite / E. Fujii, M. Ohkubo, K. Tsuru et al.// *Acta Biomaterialia*. – 2006, – V. 2, №1. – P. 69-74.
208. Shea, J. E. Skeletal function and structure: Implications for tissue-targeted therapeutics: Targeted Drug Delivery for Musculoskeletal Diseases / J.E. Shea, S.C. Miller // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2005, – V. 57, №7. – P. 945-957.
209. Sims, N.A. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit / N.A Sims, T.J.Martin // *BoneKEY Reports*. – 2014, – V. 3, №483. – P. 1-10.
210. Singer, A.J. Cutaneous wound healing / A.J. Singer, R.A. Clark // *The New England Journal of Medicine*. – 1999, – V. 341, №10. – P. 738-746.
211. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics / T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus et al.// *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2000, – V. 51, №3. – P. 475-483.
212. Stem cells combined with bone graft substitutes in skeletal tissue engineering / Z. Gamie, G.T. Tran, G. Vyzas et al.//*Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2012, – V. 12, №6. – P. 713-729.

213. Stevens, M.M. Biomaterials for bone tissue engineering / M.M. Stevens // *Materials Today*. – 2008, – V. 11, №5. – P. 18-25.
214. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) / P. Bourin, B.A. Bunnell, L. Casteilla et al.// *Cytotherapy*. – 2012, – V. 15, №6. – P. 641-648.
215. Substrate-dependent gene regulation of self-assembled human MSC spheroids on chitosan membranes / H.-Y. Yeh, B.-H. Liu, M. Sieber, S.-H. Hsu et al.// *BMC Genomics*. – 2014, – V. 15, №1. – P. 10.
216. Sun, H. Calcium Phosphate Scaffolds Combined with Bone Morphogenetic Proteins or Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Engineering / H. Sun, H.-L. Yang // *Chinese Medical Journal*. – 2015, – V. 128, №8. – P. 1121-1127.
217. Surface energy of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion / E.A. dos Santos, M. Farina, G.A. Soares et al.// *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2008, – V. 19, №6. – P. 2307-2316.
218. Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics / J.Y. Lim, X. Liu, E.A. Vogler et al.// *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2004, – V. 68A, №3. – P. 504-512.
219. T and B cells participate in bone repair by infiltrating the fracture callus in a two-wave fashion / I. Könnecke, A. Serra, T. El Khassawna, et al.// *Bone*. – 2014, – V. 64, – P. 155-165.
220. Taichman, R. S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche / R. S. Taichman // *Blood*. – 2005, – V. 105, №7. – P. 2631-2639.
221. Teitelbaum, S.L. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis / S.L. Teitelbaum // *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. – 2000, – V. 18, №6. – P. 344-349.

222. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration / X. Lin, S. Patil, Y.-G. Gao et al.// *Frontiers in Pharmacology*. – 2020, – V. 11, – P. 757.
223. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing / P. Kolar, K. Schmidt-Bleek, H. Schell et al.// *Tissue Engineering. Part B, Reviews*. – 2010, – V. 16, №4. – P. 427-434.
224. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro / X. Li, C.A. Blitterswijk, Q. Feng et al.// *Biomaterials*. – 2008, – V. 29, №23. – P. 3306-3316.
225. The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals / S. Khoshniat, A. Bourguine, M. Julien et al.// *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2011, – V. 68, №2. – P. 205-218.
226. The fate of soft callus chondrocytes during long bone fracture repair / J.L. Ford, D.E. Robinson, B.E. Scammell // *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. – 2003, – V. 21, №1. – P. 54-61.
227. The influence of surface roughness of titanium on beta1- and beta3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells / F. Lüthen, R. Lange, P. Becker et al.// *Biomaterials*. – 2005, – V. 26, №15. – P. 2423-2440.
228. The Mesenchymal Precursor Cell Marker Antibody STRO-1 Binds to Cell Surface Heat Shock Cognate 70 / S. Fitter, S. Gronthos, S.S. Ooi et al.// *Stem cells*. – 2017, – V. 35, №4. – P. 940-951.
229. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More / S.L. Dallas, M. Prideaux, L.F. Bonewald // *Endocrine Reviews*. – 2013, – V. 34, №5. – P. 658-690.
230. The secretome of mesenchymal stem cells and oxidative stress: challenges and opportunities in cell-free regenerative medicine / B. Rahimi, M. Panahi, N. Saraygord-Afshari et al.// *Molecular Biology Reports*. – 2021, – V. 48, – P. 5607–5619.
231. Theman, T.A. The role of the calcium-sensing receptor in bone biology and pathophysiology / T.A Theman., M.T. Collins // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2009, – V. 10, №3. – P. 289-301

232. Three dimensional fabrication custom-made bionic bone preoperative diagnosis models for orthopaedics surgeries / Y.E. Wang, X.P. Li, M.M. Yang et al.// *SCIENTIA SINICA Informationis*. – 2015, – V. 45, №2. – P. 235-247.
233. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review / X. Wang, S. Xu, S. Zhou et al.// *Biomaterials*. – 2016, – V. 83, – P. 127-141.
234. Tsapikouni, T. S. Protein–material interactions / T.S. Tsapikouni, Y.F. Missirlis // *Materials Science and Engineering: B*. – 2008, – V. 152, №1. – P. 2-7.
235. Tunable hydroxyapatite wettability: Effect on adhesion of biological molecules / D. Aronov, R. Rosen, E.Z. Ron et al.// *Process Biochemistry*. – 2006, – V. 41, №12. – P. 2367-2372.
236. Type I collagen promotes proliferation and osteogenesis of human mesenchymal stem cells via activation of ERK and Akt pathways / K.-S. Tsai, S.-Y. Kao, C.-Y. Wang et al.// *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2010, – V. 94, №3. – P. 673-682.
237. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants / U. Meyer, U. Joos, J. Mythili et al.// *Biomaterials*. – 2004, – V. 25, №10. – P. 1959-1967.
238. Unique roles of phosphorus in endochondral bone formation and osteocyte maturation / R. Zhang, Y. Lu, L. Ye et al.// *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2011, – V. 26, №5. – P. 1047-1056.
239. Upgrading Calcium Phosphate Scaffolds for Tissue Engineering Applications / S. Sánchez-Salcedo, D. Arcos, M. Vallet-Regí // *Key Engineering Materials*. – 2008, – V. 377, – P. 19-42.
240. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing / J. Shao, W. Zhang, T. Yang // *Biological Research*. – 2015, – V. 48, №62. – P. 1-7.

241. Wang, W. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review/ W. Wang, K. W. K. Yeung //Bioactive Materials. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair – 2017. – V. 2, №4. – P. 224-247.
242. Wang, Y.-K. Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation / Y.-K. Wang, C.S. Chen // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2013, – V. 17, №7. – P. 823-832.
243. Ye, B. Ca²⁺ oscillations and its transporters in mesenchymal stem cells / B. Ye // Physiological Research. – 2010, – V. 59, №3. – P. 323-329.
244. Zayzafoon, M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation / M. Zayzafoon // Journal of Cellular Biochemistry. – 2006, – V. 97, №1. – P. 56-70.