

Шуныкин Егор Олегович

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ СТРОМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ТРЕХМЕРНОГО
МОДЕЛИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ**

1.5.5. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 матриксов, с другой (Ayoub A., Al-Fotawei R., 2015) Хорошо известна способность ССК дифференцироваться в остеогенном направлении при контакте с гидроксипатитом 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 ССК 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. ССК 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 ССК 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, 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 работы: изучить морфофункциональные реакции стромальных стволовых клеток жировой ткани человека в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани.

В соответствии с указанной целью решались **следующие задачи:**

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 работы

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 диссертационного 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 (10×10×1мм³), выполненные в виде подложек из коммерчески чистого титана, несущих двухстороннее рельефное (индекс шероховатости Ra=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).

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.

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

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 21 рисунками 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы 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. Дизайн исследования схематично представлен на рис. 1.

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 10×10×1мм³ (стороны квадрата; толщина).

Морфология поверхности рентгеноаморфных 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. Топография искусственной КФ поверхности близка к таковой в минеральной части костной ткани при ее ремоделировании. 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 пересевали до достижения конfluence 4 раза (каждый пассаж длился 5-7 дней) для увеличения популяции ССК. Питательную среду заменяли свежей порцией каждые 3-4 дня.

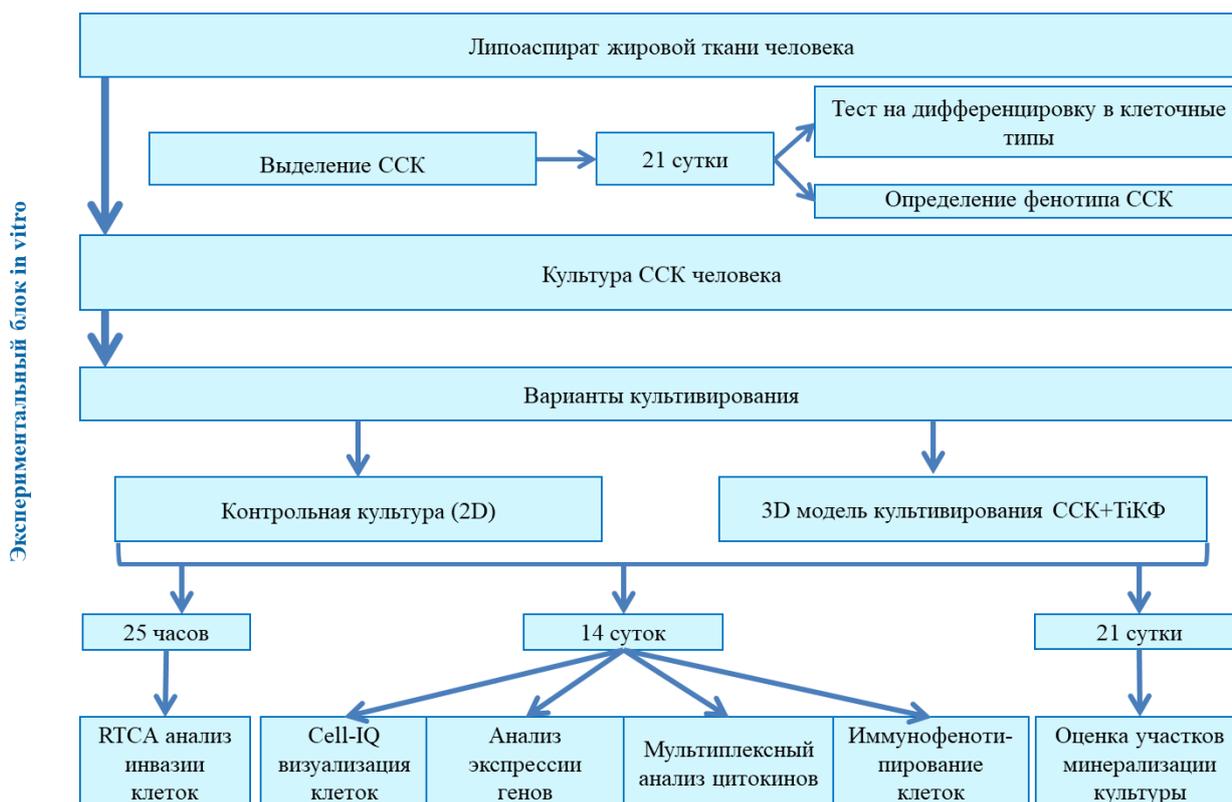


Рисунок 1 - Дизайн исследования. Ra - индекс шероховатости КФ поверхности.

В экспериментах использовали адгезирующие к пластику клетки после 5 пассажей. Для открепления адгезированных клеточных культур от пластика флаконы с культурой промывали 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 надсадок и доводили клеточную взвесь в осадке до 1 мл питательной средой.

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

Оценка уровня цитотоксичности TiКФ образцов проводилась в соответствии с рекомендациями ГОСТ 10993-5-2011. ССК помещались в среду DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США) с TiКФ образцами на протяжении 14 суток при 37 °C, 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 определялась общая клеточность и жизнеспособность клеточных культур.

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. Степень окрашивания визуально оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy, США).

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

Фенотипирование клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием набора MSC Phenotyping Kit human (Miltenyi Biotec, Германия).

В связи с высокой гетерогенностью первичных клеточных культур, получаемых из человеческого организма, была проведена дифференцировочная и фенотипическая идентификации принадлежности выделенного пула клеток к СКК 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).

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 лунки планшета образцов с КФ-покрытием на титановой Ti подложке (TiКФ).

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.

Методом проточной флуориметрии количественно определяли концентрации факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов (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) в супернатантах культур (тест-система Bio-Plex Pro Human cytokine Group II 21-Plex Panel, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) согласно протоколу фирмы-производителя. Результаты считывали на автоматическом фотометре для микропланшетов Bio-Plex (Bio-Plex[®] Luminex 200 Systems, Bio-Rad, США) с использованием программы Bio-Plex Manager (Bio-Rad, США).

Для определения способности стромальных стволовых клеток формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру с помощью образцов с КФ-покрытием на титановой подложке проводили эксперимент по прямому сокультивированию клеточных культур на TiКФ образцах.

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^oC, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Негативным контролем служила культура ССК (5 \times 10⁴ 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-матриksom в течение 21 суток.

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).

Оценка направленной миграции ССК через поры в мембране (инвазия), имитирующие поры кровеносных сосудов, проводилась с использованием электродной системы непрерывного наблюдения – xCELLigence[®] RTCA DP (ACEA Biosciences Inc., США).

Изменения импеданса, снятого с этих электродов специального планшета, показывают площадь пористой мембраны, занятую клетками на данный момент после инвазии через поры. Этот показатель визуализирует влияние наночастиц ГАП на положительную миграцию (инвазию) ССК в культуре клеток. Показания импеданса снимали каждые 15 мин в течении 25 часов. Для каждой экспериментальной группы использовали по 4 лунки.

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 TiКФ образца было отмечено значимое различие уровня продукции фактора по сравнению с контрольными культурами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стромальные стволовые клетки (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 PD (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, мигрировали и пролиферировали, 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.

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-матрикса 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.

По результатам анализа способности стромальных стволовых клеток жировой ткани человека формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру с помощью образцов с КФ-покрытием на титановой подложке показано, 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. 2А, 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-матриков (рис. 2Б). Рисунок 3Б демонстрирует, что клетки не просто смываются с КФ поверхности, а передвигаются на пластик с образцов, имеющих высоту не менее 1 мм, 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.2А, ряд 4; рис.3Д) и после удаления 3D-матриков из культуры (рис. 2А, ряд 2; рис. 3В) окраска остеобластов ализариновым красным не выявляется.

Интересно, что ССК окрашиваются ализариновым красным после прямого контакта с 3D-матриком не так интенсивно, как в двумерной остеогенной дифференцировочной среде на пластике (рис. 2, ряд 1; рис. 3Г), но площадь окраски более чем в 3 раза ($p < 0,05$) больше. 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". Обнаружен новый феномен трехмерной культуры клеток *in vitro*: остеогенная дифференцировка вокруг образцов с растворимыми КФ 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.

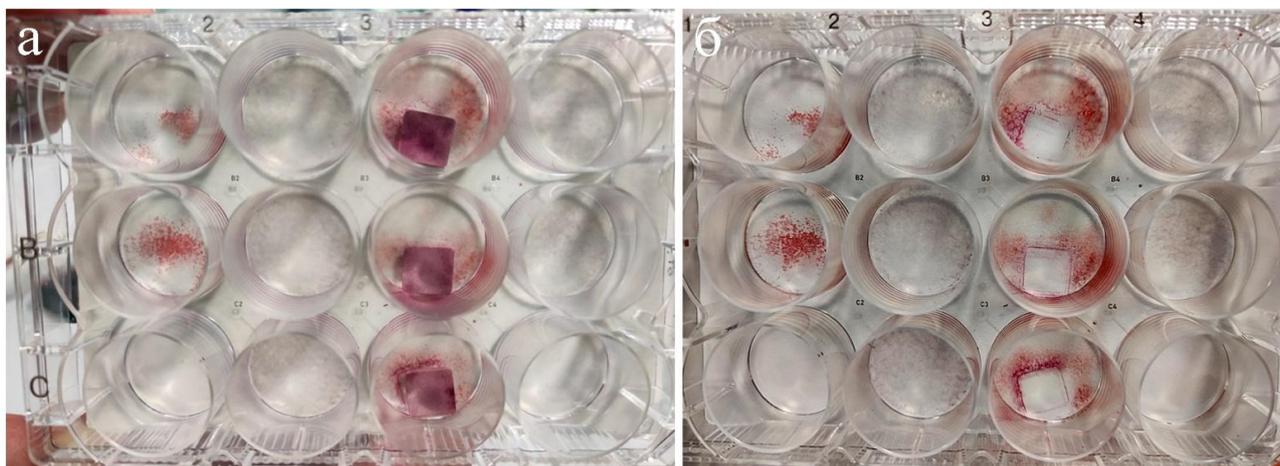


Рисунок 2 - Внешний вид 21-дневных клеточных культур в 12-луночных планшетах до (А) и после удаления (Б) титановых матриков с кальцийфосфатным покрытием для выявления способности стромальных стволовых клеток жировой ткани человека формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру. Окраска ализариновым красным S.

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.2,3; табл.2) по типу "ползучего остеогенеза" (остеокондукции) (Kübler N.R., 1997).

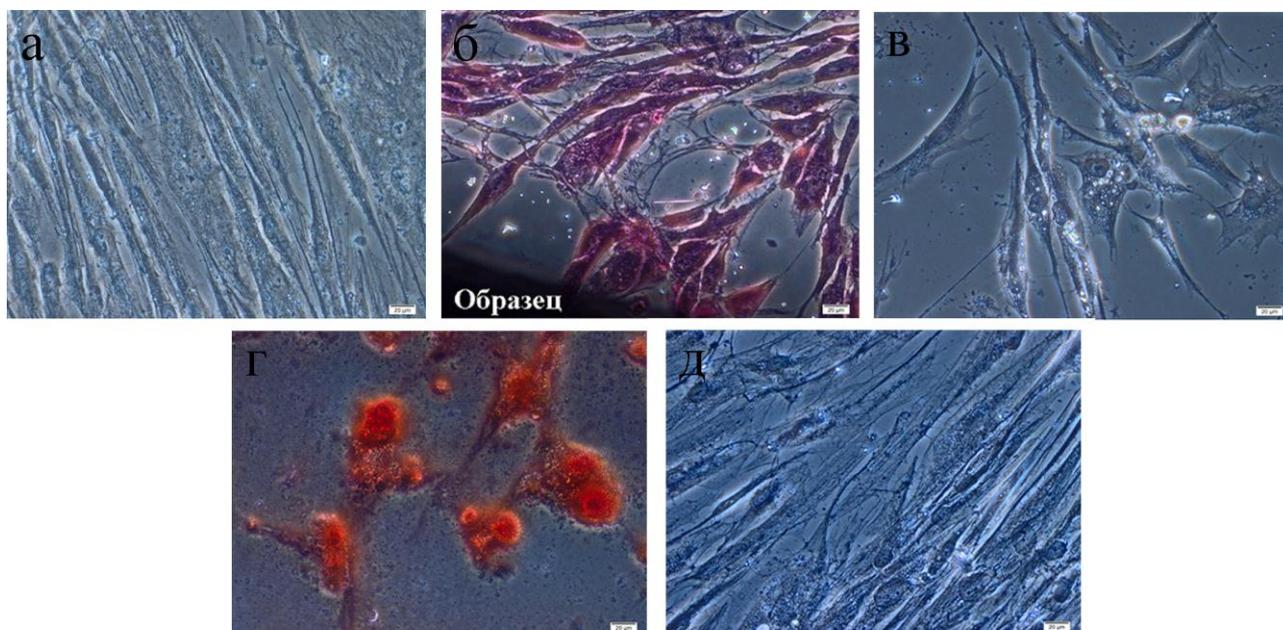


Рисунок 3 - Микрофотографии 21-дневной культуры ССК жировой ткани человека при выявлении их способности формировать *in vitro* трехмерную остеогенную культуру с помощью образцов с КФ-покрытием на титановой Ti подложке: а) состояние клеток до окраски. Окрашенные клетки (б-д): б) Эмиграция клеток с поверхности образца, перенесенного в бесклеточную ППС после 24 ч сокультивирования с ССК (ряд 3 планшета на рис.2); в) Состояние культуры клеток на пластике после удаления образцов через 24 ч культивирования (ряд 2 на рис.2); г) Позитивный контроль остеогенной дифференцировки и созревания клеток на пластике в остеогенной среде (ряд 1 на рис.2); д) Негативный контроль остеогенной дифференцировки и созревания клеток на пластике в стандартной среде без остеогенных добавок (ряд 4 на рис.2). Окраска ализариновым красным S. Шкала 20 мкм, увеличение 100.

При проведении экспериментов с опосредованным контактом TiКФ образцов с культурами ССК жизнеспособность клеточных культур 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, что говорит об отсутствии цитотоксичности TiКФ образцов.

Согласно полученным результатам, представленным в табл.4, TiКФ образцы не вызывают накопления продуктов биodeградации в 1-2-недельных бесклеточных экстрактах. 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. 1). С другой стороны, отмечена прибавка массы TiКФ образцов в динамике теста на биodeградацию (табл. 1), что свидетельствует в пользу обратного осаждения (преципитации) ионов из раствора на КФ покрытие.

Таблица 1 – 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, n=3	0,09 (0,04-0,09)	0,23 (0,21-0,24)	4,77 (4,40-5,02)	0,11 (0,08-0,13)
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.

При этом, содержание фракций общего и свободного (ионизированного) кальция в трехмерной культуре статистически значимо снижалось (на 8 % и на 3,5 %) в сравнении с контрольной культурой ССК жировой ткани человека (табл.2), несмотря на присутствие КФ покрытия.

Таблица 2 – 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 ССК в *in vitro* культуре может свидетельствовать в пользу их дифференцировки в остеобласты, поскольку именно костные клетки контролируют процессы минерализации межклеточного матрикса.

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

Выявлено визуально, что в 3D модели значительно увеличивается интенсивность окраски и количество фокусов окрашивания ализариновым красным (рис. 4б) в процессе минерализации межклеточного вещества при сокультивировании ССК с TiКФ образцами. Межклеточное вещество в 2D культурах (рис. 4а)

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. 4а,б).

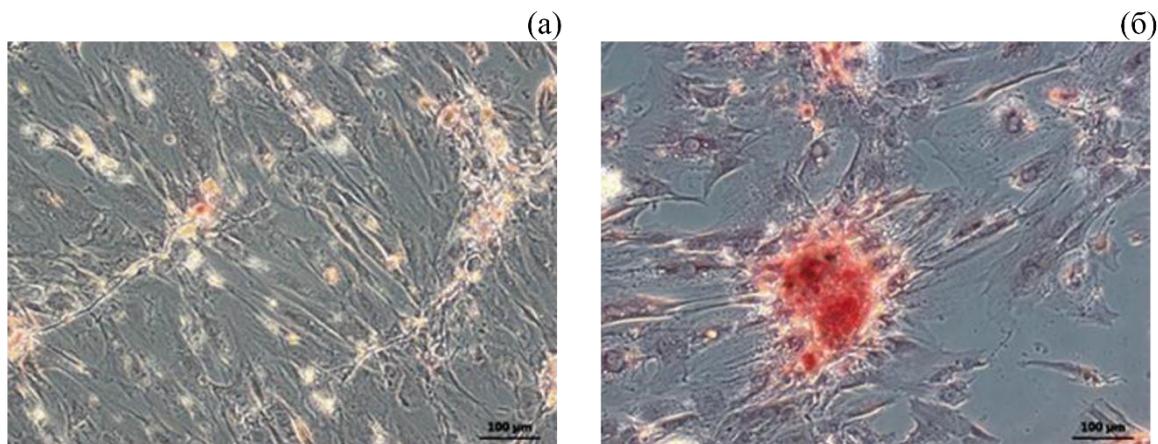


Рисунок 4 - Морфологическое состояние 21-суточной культуры стромальных стволовых клеток жировой ткани человека в стандартной среде DMEM/F12 при сравнительном окрашивании ализариновым красным участков минерализации межклеточного вещества: (а) 2D-культура клеток (контроль), (б) в присутствии 3D-матриц с КФ покрытием. Линейка в углу снимков соответствует 100 мкм.

Компьютерная морфометрия показала (табл. 3), 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. 3), что статистически значимо превышало соответствующие контрольные значения.

Таблица 3 – 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
2D-культура ССК (контроль), n=4	0	0	0
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 секретирующие остеобласты.

Cell-IQ система непрерывного микроскопического наблюдения за клетками позволила установить, что эффект TiКФ образцов на функциональную (двигательную и пролиферативную) активность ССК зависит от расстояния. Так, динамика изменения клеточности в точке визуализации 01 (в противоположной стороне от образца) достоверно не отличается в контроле (2D культура) и 3D культуре, моделирующей трехмерную регенерацию костной ткани. В то же время, вблизи TiКФ образцов после 210 ч наблюдения в 3D культуре резко замедляется прирост клеточной массы ($p < 0.01$, по сравнению с 2D моделью согласно T-критерию Вилкоксона) до 10-кратных различий к 14-м суткам за счет торможения числа клеточных делений до нуля и линейной скорости клеточной миграции. Дистантный (опосредованный) эффект TiКФ 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 КФ поверхность. При этом ионная преципитация преобладала, что вызвало рост массы образцов к концу наблюдения (табл.3).

По данным рентгенофазового анализа, микродуговые КФ покрытия не имеют в своем составе ГАП, однако, содержит атомы фосфора и кальция, а также фазу монетита (CaHPO_4). Хотя точный механизм остеоиндукции, обусловленной КФ материалами, в настоящее время неизвестен, установлена взаимосвязь между растворением материала и его остеогенностью (Yuan H. et al., 2010). В свою очередь, RTSA 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. 5) системы RTSA в 1.5 раза ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной пробой без ГАП

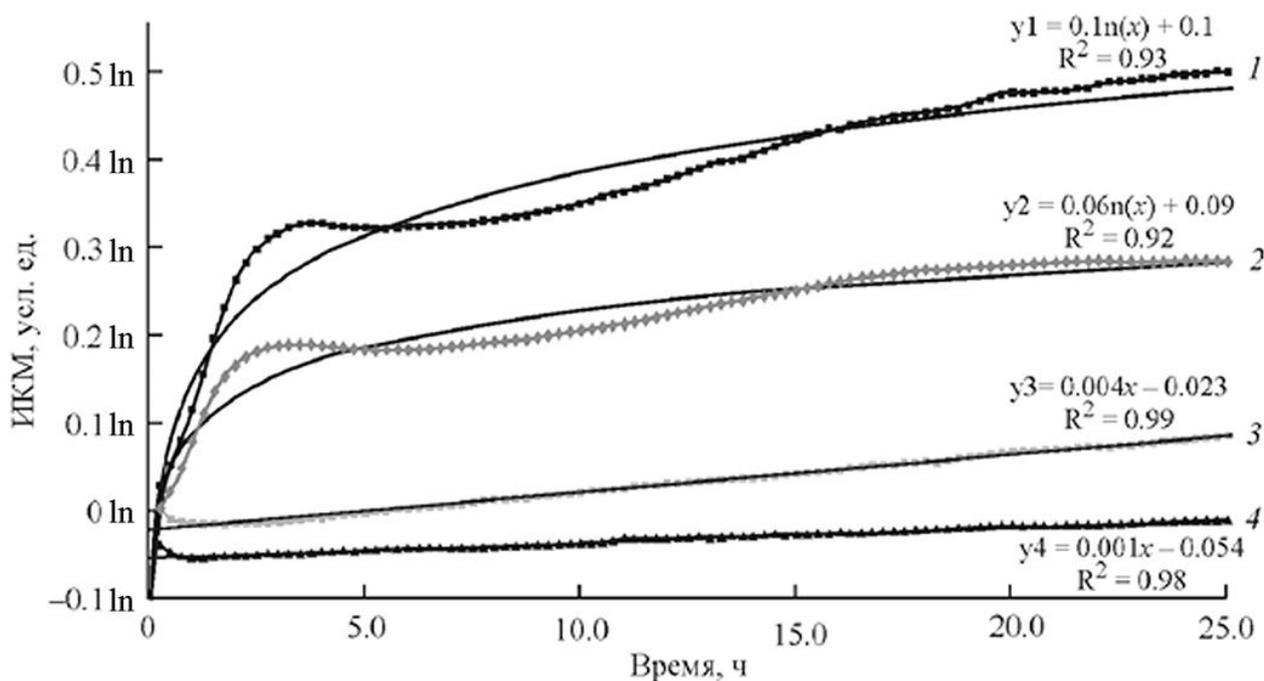


Рисунок 5 - Экспериментальные кривые (1—4) и кривые регрессии (сплошные линии y1—y4) изменения импеданса в RTSA системе, отражающего индекс клеточной миграции (ИКМ) стромальных стволовых клеток жировой ткани человека через микропористую мембрану

(y1) в присутствии нановзвеси гидроксиапатита (y2). Кривые 3 и 4 показывают изменения импеданса, когда в верхней камере нет клеток; в нижней камере находятся либо нанодисперсия ГАП (y3) либо стандартная культуральная бесклеточная среда (y4).

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). 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. 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.

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 секрета в ССК варьирует в разных условиях. Эти секретируемые компоненты играют решающую роль в улучшении выживаемости клеток, регуляции регенерации поврежденных тканей (Rahimi B. et al., 2021).

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.

В результате оценки экспрессии генов остеодифференцировки показано, что 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. 4). Значимые различия в экспрессии других анализируемых генов не обнаружены.

Таблица 4 - Уровни относительной экспрессии генов в стромальных стволовых клетках 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>BMP6</i>	1.40(1.04; 1.69) *
<i>ALPL</i>	1.43(1.03; 1.63) *

Примечание: кратность (разы) экспрессии относительно референсного гена RPLPO получены при помощи оценки стандартной ошибки (SE) с помощью модифицированной формулы Пфаффла, (-) 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

По результатам мультиплексного анализа по оценке содержания факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в супернатантах показано что, ССК в стандартной двумерной (2D) культуре секретируют не менее 20 факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов. Моделирование трехмерной (3D) культуры приводило к мало выраженному изменению секреторного профиля ССК жировой ткани человека (табл.5). 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.

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.

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 GROa (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. По данным корреляционного анализа, 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).

Таблица 5. 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.

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, 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. Общая схема внутригрупповых корреляционных взаимосвязей отражена на рисунке 6.

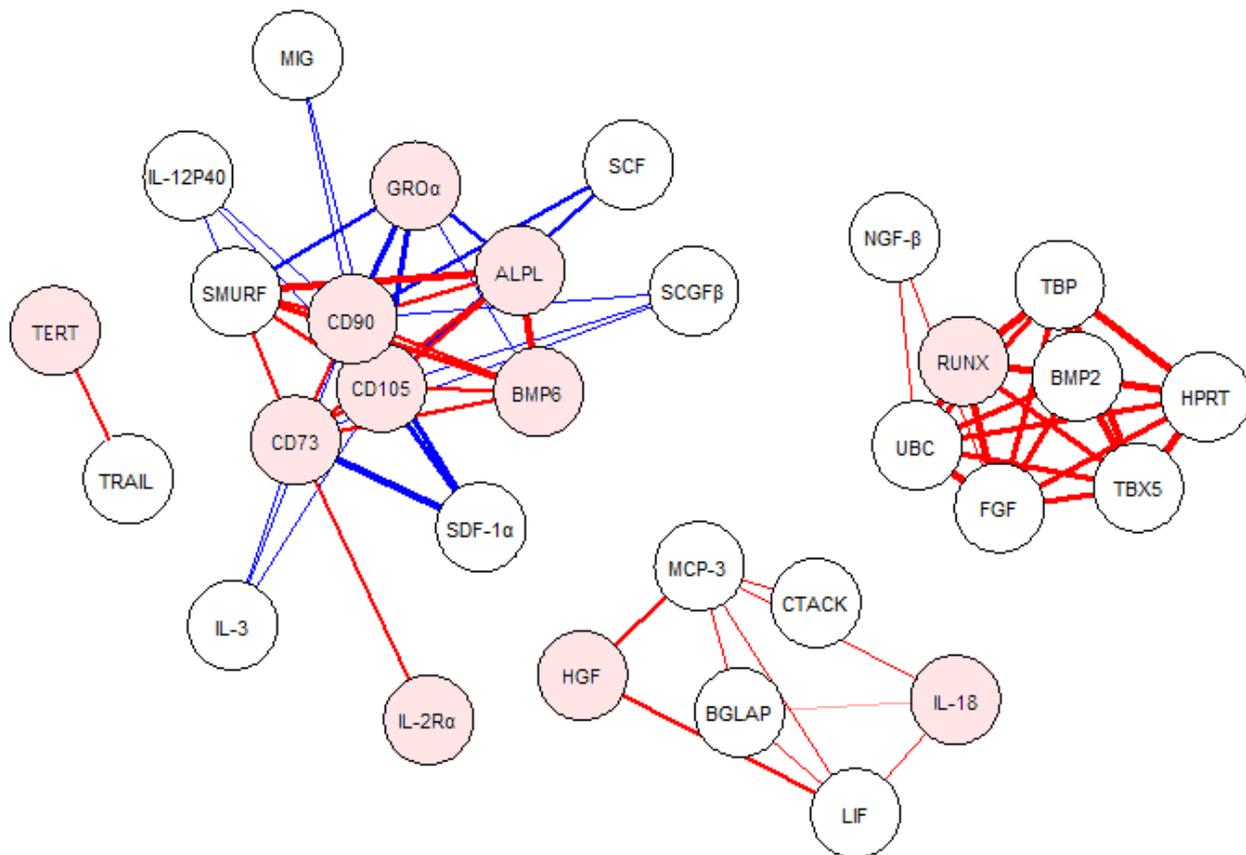


Рисунок 6 - Схема корреляционных связей в 3D-модели культуры ССК человека. Красным выделены положительные, синим – отрицательные корреляции. Сила корреляционных взаимосвязей при $r > 0,6$ выделена шириной линии, соединяющей показатели.

Таким образом, к 14-м суткам в 3D культуре ССК жировой ткани человека формируется трехмерная сеть взаимодействующих плеiotропных 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, стромальные стволовые клетки (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 остео модулирующих цитокинов/хемокинов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Малащенко В.В., Мелашенко Е.С., Тодосенко Н.М., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., **Шуныкин Е.О.**, Хлусов И.А. Изменение поведения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при контакте с синтетическими фосфатами кальция *in vitro* // **Цитология**. – 2017. – Т. 59. – №. 12. – С.858-866. (импакт-фактор РИНЦ 0,435).
2. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Малащенко В.В., Мелашенко Е.С.,

- Шуныкин Е.О.**, Хлусов И.А. Изменение фенотипа ММСК при культивировании с рельефным кальций-фосфатным покрытием // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии», Рязань, 5 – 8 октября – 2017. – С. 78 – 81.
3. Литвинова Л.С., Юрова К.А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Малащенко В.В., **Шуныкин Е.О.**, Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Галецкий М.И., Коржанова М., Хлусов И.А. Дистантное влияние искусственного трехмерного матрикса на остеогенную дифференцировку *in vitro* культуры ММСК-ЖТ // **Гены & Клетки**. – 2018. – Т. XIII (Приложение 2). – С. 74 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,914).
 4. **Шуныкин Е.О.**, Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Чайкина М.В., Мелашенко Е.С., Хлусов И.А. *In vitro* оценка миграционной активности ММСК при контакте с наночастицами синтетического гидроксиапатита с использованием электродной системы RTCA. // Издательство: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова: Материалы всероссийской научной конференции "Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей". Рязань, 05-06 октября 2018 г. – С. 32-34.
 5. Litvinova L., Yurova K., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Melashchenko E., Todosenko N., Malashchenko V., **Shunkin E.**, Sharkeev Y., Komarova E., Sedelnikova M., Khlusov I. Epigenetic changes of MMSCs under the influence of calcium phosphate coating with different roughness // Symposium Systems Biology and Biomedicine, Novosibirsk, 21 – 22 Aug. – 2018. – С. 83.
 6. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Малащенко В.В., **Шуныкин Е.О.**, Мелашенко Е.С., Хлусова М.Ю., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., Шаркеев Ю.П., Иванов П.А., Хлусов И.А. Секретия сигнальных молекул кроветворных ниш в условиях остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, индуцированной рельефным кальций-фосфатным покрытием // **Биомедицинская химия**. – 2019. – Т. 65. – № 4– С.339-346. (Q4 Scopus, SJR = 0.19).
 7. Юрова К. А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Шаркеев Ю.П., Малащенко В.В., **Шуныкин Е.О.**, Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Секретия провоспалительных цитокинов клетками, участвующими в регенерации костной ткани // **Гены & Клетки**. – 2019. – Т. XIV (Приложение). – С. 269–270 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,914).
 8. Юрова К.А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Малащенко В.В., **Шуныкин Е.О.**, Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Влияние 3D-матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань, на дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // **Гены & Клетки**. – 2019. - Т. XIV (Приложение). - С. 269 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,914).
 9. Юрова К. А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., **Шуныкин Е.О.**, Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Оценка морфологического состояния мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при культивировании в присутствии трехмерных матрикса, имитирующего минеральное вещество регенерирующей костной ткани // **Гены & Клетки**. – 2019. – Т. XIV (Приложение). – С. 268 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,914).
 10. Khlusov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Yurova K.A., **Shunkin E.O.**, Krivosheev V.V., Porokhova E.D., Sizikova A.E., Safiullina L.A., Legostaeva E.V., Komarova E.G., Sharkeev Y.P. Costimulatory Effect of Rough Calcium Phosphate Coating and Blood Mononuclear Cells on Adipose-Derived Mesenchymal Stem

- Cells In Vitro as a Model of In Vivo Tissue Repair // **Materials (Basel)**. – 2020. – V. 13. – №. 19. – С. 4398. (Q2 Scopus, SJR = 0.62)
11. Litvinova L., Yurova K., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., **Shunkin E.**, Melashchenko E., Todosenko N., Khlusova M., Sharkeev Y., Komarova E., Sedelnikova M., Khlusov I. Gene Expression Regulation and Secretory Activity of Mesenchymal Stem Cells upon In Vitro Contact with Microarc Calcium Phosphate Coating // **Int. J. Mol. Sci.** – 2020. – V. 21. – №. 20. – С. 7682. (Q1 Scopus, SJR = 1.46)
 12. Litvinova L.S., Malashchenko V.V., **Shunkin E.O.**, Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Melashchenko E.S., Khlusov I.A., Komarova E.G., Chebodaeva V.V., Sharkeev Y.P. Multilevel calcium phosphate coating: A model of bone-like topography for osteoimmunology // **AIP Conference Proceedings**. – 2020; V. 2310. – №. 1 (Q4 Scopus, SJR = 0.18).
 13. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А., **Шунькин Е.О.**, Тодосенко Н.М., Мелашченко Е.С., Литвинова Л.С. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор // **Цитология**. – 2020. – Т. 62. – № 5. – С. 305-315.
 14. Юрова К.А., Мелашченко Е.С., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Мелашченко О.Б., Шунькин Е.О., Норкин И.К., Хлусов И. А., Литвинова Л. С. Мезенхимные стволовые клетки: краткий обзор классических представлений и новых факторов остеогенной дифференцировки // **Медицинская иммунология**. – 2021. – Т. 23. – № 2. – С. 207-222 (Q4 Scopus, SJR = 0.13).

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2D (от англ. 2-dimensional) – двумерная культура	ПЦР – полимеразная цепная реакция
3D (от англ. 3-dimensional) – трехмерная культура	ССК- стромальные стволовые клетки
TiКФ- образцы с кальцийфосфатной поверхностью на подложке из титана	СФВ- стромально-васкулярная фракция
ГАП- гидроксиапатит	ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
ИКМ- индекс клеточной массы	ЭТС - эмбриональная телячья сыворотка
КФ - кальцийфосфатный	RTCA - real-time cell analyzer
ППС - полная питательная среда	

Шунькин Егор Олегович

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ
СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ
ТРЕХМЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ
КОСТНОЙ ТКАНИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

1.5.5. Физиология человека и животных

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