

## РОЛЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ/СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГУЛЯЦИИ КРОВЕТВОРЕНИЯ В 3D-КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Иванов П.А.<sup>1</sup>, Юрова К.А.<sup>1</sup>, Хазиахматова О.Г.<sup>1</sup>, Шуплецова В.В.<sup>1</sup>, Малащенко В.В.<sup>1</sup>, Шунькин Е.О.<sup>1</sup>, Норкин И.К.<sup>1</sup>, Хлусов И.А.<sup>1,2</sup>, Литвинова Л.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Резюме.** Статья посвящена исследованию роли мезенхимных стромальных/стволовых клеток (МСК) в формировании микроокружения для гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в условиях, имитирующих физиологическое костное ремоделирование в присутствии искусственных трехмерных матриц (Ra = 2-3 мкм) с кальций-фосфатным покрытием *in vitro*. Исследование проводилось с использованием экспериментальных образцов искусственных имплантатов, полученных в электролите из наночастиц гидроксиапатита (ГАП), изготовленных в институте физики прочности и материаловедения СО РАН. В работе были использованы культуральные и инструментальные методы исследования. Оценку фенотипического потенциала клеток проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Определение уровней цитокинов/хемокинов в супернатантах клеточных культур оценивали методом проточной флуориметрии. Выявление содержания кроветворных клеток в полях зрения, а также участков минерализации межклеточного матрикса проводили с использованием цитоморфометрии.

В ходе проведенного исследования было выявлено, что трехмерные матрицы с кальций-фосфатным покрытием *in vitro* инициируют формирование специфического микроокружения МСК, потенцирующего увеличение количества ГСК с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> (14-е сутки), рост числа клеток с морфологией гемопоэтических и появление очагов минерализации межклеточного матрикса (21-е сутки). Изменение числа кроветворных клеток в полях зрения происходило, преимущественно за счет опосредованного влияния гемопоэтинов SCF и G-CSF, на фоне снижения проапоптотического фактора TRAIL. Также было установлено, что МСК снижают уровень провоспалительных цитокинов (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IP-10, IL-2, IL-6) в среде культивирования в присутствии искусственных 3D-матриц с кальций-фосфатным покрытием. Выявленные особенности функционирования МСК в условиях, имитирующих физиологическое костное ремоделирование, при сокультивировании с трехмерными матриксами (Ra = 2-3 мкм) показывают значимое влияние МСК на регуляцию локального микро-

### Адрес для переписки:

Литвинова Лариса Сергеевна  
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет  
имени Иммануила Канта»  
236001, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, б,  
к. 302.  
Тел.: 8 (4012) 595-595 (доб. 6134).  
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

### Address for correspondence:

Litvinova Larisa S.  
Immanuel Kant Baltic Federal University  
236001, Russian Federation, Kaliningrad, Gaidar str.,  
6,302.  
Phone: 7 (4012) 595-595 (acc. 6134).  
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

### Образец цитирования:

П.А. Иванов, К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, В.В. Шуплецова, В.В. Малащенко, Е.О. Шунькин, И.К. Норкин, И.А. Хлусов, Л.С. Литвинова «Роль мезенхимных стромальных/стволовых клеток в регуляции кроветворения в 3D-культуре *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 153-160.  
doi: 10.46235/1028-7221-992-ROS

© Иванов П.А. и соавт., 2021

### For citation:

P.A. Ivanov, K.A. Yurova, O.G. Khaziakhmatova, V.V. Shupletsova, V.V. Malaschenko, E.O. Shunkin, I.K. Norkin, I.A. Khlusov, L.S. Litvinova "Role of mesenchymal stromal/stem cells in regulation of hemopoiesis in 3D *in vitro* culture", Russian Journal of Immunology/ Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 153-160.  
doi: 10.46235/1028-7221-992-ROS

DOI: 10.46235/1028-7221-992-ROS

окружения ГСК посредством модулирующего эффекта цитокинов, хемокинов и факторов роста, обеспечивающих межклеточное взаимодействие.

Появление участков минерализации межклеточного матрикса, наблюдаемое при культивировании МСК в присутствии 3D-матрикса, имитирующего минеральное вещество костной ткани, свидетельствует также о формировании остеобластных ниш в условиях культивирования *in vitro*.

Полученные результаты имеют важное значение для выявления особенностей функционирования нишевых территорий ГСК и роли МСК в их формировании и поддержании микроокружения.

Полученные результаты могут найти практическое применение при разработке новых классов медицинских изделий, способных обеспечить эффективную остеоинтеграцию.

*Ключевые слова:* мезенхимальные стромальные/стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, остеобласты, очаги минерализации, костная ткань, костное ремоделирование

## ROLE OF MESENCHYMAL STROMAL/STEM CELLS IN REGULATION OF HEMOTORATION IN 3D *IN VITRO* CULTURE

Ivanov P.A.<sup>a</sup>, Yurova K.A.<sup>a</sup>, Khaziakhmatova O.G.<sup>a</sup>, Shupletsova V.V.<sup>a</sup>,  
Malaschenko V.V.<sup>a</sup>, Shunkin E.O.<sup>a</sup>, Norkin I.K.<sup>a</sup>, Khlusov I.A.<sup>a, b</sup>,  
Litvinova L.S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

<sup>b</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Abstract.** The article is devoted to studying the role of mesenchymal stromal cells in formation of microenvironment for hematopoietic stem cells under the conditions mimicking physiological bone remodeling in presence of artificial three-dimensional matrices ( $Ra = 2-3 \mu m$ ). The study was carried out using experimental samples of artificial implants obtained in electrolyte from hydroxyapatite nanoparticles (HAP) produced at the Institute of Strength Physics and Materials Science (Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences). The work included cultural and instrumental research techniques. Phenotypic profile of cells was assessed by flow cytometry. Determination of cytokine/chemokine levels from cell culture supernatants was assessed by flow fluorimetry. Detection of hematopoietic cells in the vision fields, as well as areas of extracellular matrix mineralization was carried out by means of cytomorphometry.

It was revealed that the 3D matrices with a calcium phosphate coating initiate the *in vitro* formation of specific microenvironment of MSCs, resulting in the increased numbers of HSCs with the  $CD45^+CD34^+$  phenotype (at 14 days), an increased number of cells with hematopoietic morphology and evolving foci of extracellular matrix mineralization of the (at 21 days). Changed numbers of hematopoietic cells per vision field occurred, mainly, due to indirect effect of hematopoietic factors (SCF and G-CSF), along with decrease of proapoptotic factor TRAIL. It was also found that MSCs reduce the level of proinflammatory cytokines ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IP-10, IL-2, IL-6) in culture medium in the presence of artificial 3D calcium-phosphate-coated matrices. The revealed features of MSC functioning under the conditions simulating physiological bone remodeling, upon co-cultures with three-dimensional matrices ( $Ra = 2-3 \mu m$ ), have shown a significant effect of MSCs upon regulation of HSCs by local microenvironment, through distinct modulating effects of cytokines, chemokines, and growth factors that provide intercellular interactions. Development of extracellular matrix mineralization areas during MSC cultivation in the presence of 3D matrices imitating mineral substance of bone tissue also indicates the formation of osteoblastic niches under the *in vitro* cultivation conditions.

The results obtained are important in order to assess functions of hematopoietic niches and the role of MSCs in their development and maintenance of the microenvironment.

The results obtained may find practical application in development of new classes of medical devices able to provide effective osseointegration.

*Keywords:* mesenchymal stromal/stem cells, hematopoietic stem cells, osteoblasts, mineralization foci, bone tissue, bone remodeling

Работа выполнена при финансовой поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2495.2020.7 (Балтийский федеральный университет им. И. Канта).

## Введение

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – важные структурные элементы в физиологии костной ткани, обеспечивающие формирование остеокластов. Последние являются ключевыми компонентами физиологического процесса костного ремоделирования в фазу резорбции [11]. Основными регуляторами ниши ГСК являются остеобласты – костно-формирующие клетки, которые обеспечивают поддержание покоящейся популяции примитивных ГСК в костном мозге [12].

В то же время роль мезенхимных стромальных/стволовых клеток (МСК) в создании и поддержании микроокружения для существования ниш ГСК до конца не ясна. Тем не менее их функция в обеспечении выживаемости ГСК и регуляции их дифференцировочного потенциала за счет секреции факторов роста, межклеточного взаимодействия и продукции матричных структурных белков является очевидной [10].

Исследование структурных и молекулярных особенностей нишевых микротерриторий МСК играет важную роль для выявления особенностей процессов их дифференцировки и аспектов молекулярного регулирования репарации костной ткани.

Таким образом, направленное изучение компонентов микроокружения МСК и их роли в регуляции гемопоэтической ниши является перспективным направлением, актуальным в контексте изучения фундаментальных механизмов биологии стволовых клеток, а также для эффективного развития регенеративной медицины.

В связи с вышесказанным **целью проведенного исследования** явилась оценка роли клеточно-молекулярных факторов МСК в формировании микроокружения для гемопоэтических стволовых клеток в 3D-культуре *in vitro*.

## Материалы и методы

Материалом для исследования служила культура МСК, выделенных из жировой ткани человека, сокультивируемых с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием, что моделирует границу раздела «кость/надкостница/костный мозг».

Работа с первичными культурами МСК, полученными из подкожной жировой клетчатки

человека, проводилась с соблюдением всех биоэтических норм и в соответствии с разрешением локального этического комитета Инновационного парка БФУ имени И. Канта (протокол № 1 от 22.03.2021) с получением информированного согласия на участие в исследовании и использовании биопроб.

Для проведения эксперимента использовались клетки с доказанной принадлежностью к популяции МСК в соответствии с минимальными критериями, установленными Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [3]. МСК имели фибробластоидную морфологию и адгезировались к пластику при стандартных условиях культивирования. По результатам фенотипической идентификации более 97% клеток экспрессировали молекулы CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> или CD105<sup>+</sup> и менее 3% клеток в культуре несли на своей поверхности маркеры гемопоэтических клеток – CD45, CD34, CD20 и CD14. Дифференцировочная идентификация клеток при окрашивании монослоя, после 21 дневного культивирования в дифференцировочной среде, выявила способность выделенных клеток к дифференцировке в клетки мезодермальной природы (остео-, адипо- и хондро направлением). Жизнеспособность всех исследуемых культур была 95%.

Исследование проводилось с использованием экспериментальных образцов искусственных имплантатов, имитирующих модель костного ремоделирования, с микродуговым кальций-фосфатным покрытием [9], полученных в электролите из наночастиц гидроксиапатита (ГАП), изготовленных в институте физики прочности и материаловедения СО РАН [4].

Культивирование МСК проводили в соответствии с задачами исследования, с соблюдением основных условий культивирования клеточной культуры при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> в течение 21 суток. Для постановки эксперимента подготавливали полную питательную среду (ППС) для культивирования (5% FBS, 400 Е/мкг/мл пенициллин/стрептомицин, 2 мМ L-глутамин, αMEM).

Группа контроля: культуры МСК жировой ткани, культивируемые *in vitro* на пластике без трехмерного матрикса в полной питательной среде на основе αMEM. Экспериментальная группа: культуры МСК жировой ткани, культивируемые *in vitro*, в присутствии искусственных 3D-матрикса (Ra = 2–3 мкм) в полной питательной среде на основе αMEM.

Оценку жизнеспособности, подсчет числа клеток, а также фенотипическую идентификацию основных показателей стромальных и гемо-

поэтических клеток (поверхностных маркеров CD105, CD73, CD90, CD45, CD14, CD20, CD34) проводили на 14-е сутки культивирования методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре MACS Quant FL7 system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия), согласно протоколам производителя (Guava ViaCount reagent (Millipore, США), Phenotyping Kit human (Miltenyi Biotec, Германия).

Количественное определение цитокинов/хемокинов с супернатантах клеточных культур оценивали на 14-е сутки культивирования методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-Plex Assays, Bio-Rad, США).

По истечении 21 дня культивирования производили морфологическую оценку клеточных культур для определения участков минерализации межклеточного матрикса, окрашивая клеточные культуры 2% раствором ализаринового красного S (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции фирмы-производителя, предварительно фиксируя клеточный монослой в забуференном 10% формалине, затем высушивали на воздухе. Далее определяли клетки, имеющие морфологию кровяных (диаметр – 10-15 мкм, наличие ядра).

Для выявления остеогенного потенциала, проводили скрининговый морфометрический анализ с использованием фиксированных культур МСК жировой ткани, прошедших остеогенную дифференцировку в среде StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на пластике (2D-модель) и в присутствии искусственных 3D-матрикса (Ra = 2-3 мкм) с оценкой содержания кровяных клеток и участков минерализации межклеточного матрикса. В качестве контроля были использованы МСК, культивируемые на пластике без 3D-матрикса в полной ростовой среде на основе  $\alpha$ MEM.

Цитологические препараты фотографировали в проходящем свете на микроскопе AxioScope 40 (Carl Zeiss, Jena, Germany) при увеличении 40-100 с помощью фотоаппарата Canon PowerShot G10 (Canon Inc., Япония) с разрешением 14,7 мегапикселей и фирменного аппаратно-программного комплекса AxioVision 4.6 (Carl Zeiss). Светочувствительность камеры на микроскопе была одинакова на протяжении всего эксперимента. Цитоморфометрическое исследование (площади, числа и оптической плотности окрашенных участков) проводили с использованием инструментов компьютерной программы Adobe Photoshop CS6 (Adobe Inc., США).

Статистическая обработка полученных результатов была проведена с использованием методов статистического описания, а также методов проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах IBM SPSS Statistics 20. Для анализа исследуемых выборок данных применяли гипотезу нормальности распределения (Колмогорова–Смирнова). Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25%-ный ( $Q_{0,25}$ ) и 75%-ный ( $Q_{0,75}$ ) квартили. Оценка статистической достоверности различий между исследуемыми выборками, которые не подчиняются закону нормального распределения, был использован критерий Манна–Уитни для независимых выборок. Для выявления корреляционных взаимосвязей между исследуемыми значениями был проведен корреляционный анализ Спирмена ( $r$ ). Различия считали статистически значимыми на уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В контрольной культуре по истечении 14 суток культивирования, содержание клеток CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> было равным 0,32 (0,25-0,35) %. В экспериментальной 3D-культуре число ГСК CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> было в 2 раза (0,61 (0,060-0,082) %) выше контрольных значений. Повышение числа ГСК происходило на фоне снижения содержания клеток с фенотипом CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>.

Нами была выявлена обратная корреляционная взаимосвязь между числом клеток CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> и содержанием клеток, экспрессирующих на мембране молекулы CD90 ( $r = -0,80$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 12$ ) и CD105 ( $r = -0,76$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 12$ ).

По истечении 14 суток культивирования было выявлено статистически значимое снижение уровня провоспалительных факторов (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IP-10, IL-6) ( $p_1 < 0,05$ ) и проапоптотического медиатора TRAIL ( $p_1 < 0,05$ ) в 3D-культуре по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). Содержание гемопоэтических факторов (G-CSF и SCF), напротив, повышалось по сравнению со значениями, полученными при оценке контрольных 2D-культур ( $p_1 < 0,05$ ).

Корреляционный анализ позволил выявить прямую зависимость между содержанием факторов G-CSF и SCF и числом гемопоэтических клеток CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> ( $r = 0,68$ ;  $r = 0,75$ ,  $p < 0,05$ ;  $n = 12$ ).

При проведении морфометрического исследования культур МСК (21-е сутки) в остеогенной дифференцировочной среде (2D-модель) количество клеток с морфологией кровяных соответствовало контрольным значениям, однако

**ТАБЛИЦА 1. СЕКРЕЦИЯ ЦИТОКИНОВ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ 14 СУТОК КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С МОДЕЛЬНЫМИ ОБРАЗЦАМИ, НЕСУЩИМИ МИКРОДУГОВОЕ ПОКРЫТИЕ РАЗНОЙ ШЕРОХОВАТОСТИ НА ТИТАНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. SECRETION OF CYTOKINES BY MSCS FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE AFTER 14 DAYS OF CULTIVATION WITH MODEL SAMPLES BEARING A MICROARC COATING OF DIFFERENT ROUGHNESS ON A TITANIUM SUBSTRATE, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Варианты культивирования МСК Variants of cultivation of MSCs	G-CSF	SCF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$	IP-10	IL-2	IL-6	TRAIL
<b>2D-контроль роста клеток в стандартной ППС</b> 2D control of cell growth in standard complete nutrient medium n = 6	15,83 (14,47-63,61)	3,92 (3,61-4,66)	65,46 (52,69-157,60)	2,12 (2,035-3,940)	19,25 (16,595-48,460)	3,25 (3,210-3,305)	484,83 (359,375-601,915)	4,37 (3,04-5,37)
<b>3D-культура в присутствии модельных матриц</b> 3D culture in the presence of model matrices, n = 3	24,39* (15,82-36,31) p <sub>1</sub> < 0,05	11,27* (4,68-11,30) p <sub>1</sub> < 0,05	28,07* (20,60-35,07) p <sub>1</sub> < 0,05	1,17* (0,81-1,82) p <sub>1</sub> < 0,05	8,23* (7,21-9,33) p <sub>1</sub> < 0,05	–	380* (286-505) p <sub>1</sub> < 0,05	2,71* (2,49-2,71) p <sub>1</sub> < 0,05

Примечание. p<sub>1</sub> – статистически достоверные различия по сравнению с контрольными значениями, полученными при оценке 2D-культур, в соответствии с критерием Манна–Уитни на уровне значимости p < 0,05.

Note. p<sub>1</sub>, statistically significant differences compared to the control values obtained when evaluating 2D cultures, in accordance with the Mann–Whitney test at a significance level of p < 0.05

**ТАБЛИЦА 2. ПЛОЩАДЬ МИНЕРАЛИЗАЦИИ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И ЧИСЛО КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК В 21-ДНЕВНОЙ IN VITRO КУЛЬТУРЕ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. MINERALIZATION AREA OF THE EXTRACELLULAR MATRIX AND THE NUMBER OF HEMATOPOIETIC CELLS IN A 21-DAY IN VITRO CULTURE OF ADIPOSE TISSUE MSCS OF HEALTHY VOLUNTEERS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Варианты культивирования МСК Variants of cultivation of MSCs	Суммарная площадь узлов минерализации (при окраске ализариновым красным), мм <sup>2</sup> на лунку Total area of mineralization nodules (when stained with alizarin red), mm <sup>2</sup> per well	Количество кроветворных клеток на 100 см <sup>2</sup> снимка с поверхности лунок планшета Number of hematopoietic cells per 100 cm <sup>2</sup> image taken from the surface of the plate wells
<b>2D-контроль роста клеток в стандартной ППС</b> 2D control of cell growth in standard complete nutrient medium n = 6	0 (0-0,15)	24 (18-27) n <sub>1</sub> = 27
<b>3D-культура в присутствии модельных матриц</b> 3D culture in the presence of model matrices n = 3	59,64 (21,26-88,47)* p < 0,001	98 (76-119)* n <sub>1</sub> = 193 p < 0,001

Примечание. n – число исследованных лунок; n<sub>1</sub> – число снимков

Note. n is the number of wells examined; n<sub>1</sub>, number of pictures.

отмечалось наличие участков минерализации межклеточного матрикса в полях зрения, суммарным размером 3,95 (1,86–6,61) см<sup>2</sup>. Анализ культуры МСК жировой ткани в присутствии остеогенной среды и 3D-матрикса (Ra = 2–3 мкм) позволил выявить достоверное увеличение количества кроветворных клеток, по сравнению с контрольными значениями (на 190%) и культурами МСК в остеогенной дифференцировочной среде на пластике (195%).

Важно отметить отсутствие островков минерализации в контрольных культурах во всех направлениях поля зрения.

Также выявлено, что в полной ростовой среде на основе  $\alpha$ MEM, в присутствии 3D-матрикса (Ra = 2–3 мкм) происходит формирование участков минерализации и регистрируется увеличение количества кроветворных клеток по сравнению с контрольными 2D-культурами ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Исследования подтверждают роль остеобластов в регуляции ниши ГСК. В ходе ряда проведенных экспериментальных работ было выявлено, что экспансия остеобластов связана с увеличением количества ГСК и, наоборот, условное удаление остеобластов связано с потерей ГСК в костном мозге и экстрамедуллярным гемопоэзе. Несмотря на эти работы, вклад остеобластных клеток, особенно зрелых остеобластов в поддержании ГСК является спорным [1]. Клеточные составляющие, формирующие нишу гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге остаются до конца неизвестны [5].

МСК обладают специфическими функциями, обеспечивая паракринное взаимодействие и формирование клеточных контактов, необходимых для сохранения и поддержания пула HSCs [8], что, вероятно, характеризует их как критических модуляторов микроокружения ниши ГСК.

По результатам проведенного исследования было выявлено, что искусственные 3D-матрицы влияют на моделирование фенотипического состава МСК, статистически достоверно повышая количество ГСК в культуре, на фоне снижения числа клеток, презентующих на клеточной мембране молекулы CD90<sup>+</sup> и CD105<sup>+</sup>. Наличие отрицательных корреляционных взаимосвязей между содержанием клеток, несущих маркеры CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> с числом клеток с фенотипом CD90 ( $r = -0,80$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 12$ ) и CD105 ( $r = -0,76$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 12$ ), свидетельствует о сопряженности клеточно-молекулярных процессов, происходящих как в популяции стромальных, так и гемопоэтических клеток.

Снижение числа клеток, презентующих молекулы CD90<sup>+</sup> и CD73<sup>+</sup>, на фоне увеличения

суммарной площади участков минерализации межклеточного матрикса, может свидетельствовать о дифференцировке стромальных клеток в остеобласты в присутствии искусственных 3D-матрикса (Ra = 2–3 мкм), имитирующих модель костного ремоделирования, что соответствует результатам, полученным ранее [4].

Изменение секрета МСК в присутствии трехмерных матрикса (по сравнению с контрольными значениями) свидетельствует об активном модулирующем влиянии искусственных имплантатов на МСК.

Как уже упоминалось ранее, МСК представляют собой гетерогенную популяцию мультипотентных клеток, которые обладают мощным иммуномодулирующим потенциалом, оказывая противовоспалительный эффект на соседние стромальные и гематопоэтические клетки [7]. В подтверждение вышесказанному, нами было выявлено снижение содержания провоспалительных цитокинов (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IP-10, IL-2, IL-6) в супернатантах 3D-модели на 14-е сутки культивирования.

Исследования последнего десятилетия показали, что при воздействии воспалительной среды МСК могут управлять местными и системными врожденными и адаптивными иммунными реакциями посредством высвобождения различных медиаторов, включая иммуносупрессивные молекулы, факторы роста, экзосомы, хемокины, компоненты комплемента и различные метаболиты. В частности, МСК жировой ткани мыши способны поддерживать рост и дифференцировку ГСК *ex vivo*, участвуя в формировании сосудистой кроветворной ниши [2].

По истечении 14 суток культивирования, в 3D-культурах было выявлено статистически значимое повышение продукции МСК фактора стволовых клеток (SCF) и колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), по сравнению с контрольными значениями. G-CSF и SCF, являясь одними из ключевых членов семейства гемопоэтических факторов роста, регулируют кроветворение, способствуя увеличению клеток-предшественников периферической крови [6]. Подтверждением вышесказанному явились выявленные нами взаимосвязи между содержанием SCF и G-CSF и количеством клеток CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> в 3D-культурах. Следует также отметить, что увеличение пула клеток с морфологией кроветворных *in vitro* и образование островков минерализации межклеточного матрикса происходит на фоне пониженного уровня апоптотического фактора TRAIL.

## Выводы

Таким образом, согласно проведенному исследованию, трехмерные матриксы (Ra = 2-3 мкм) с кальций-фосфатным покрытием способствуют формированию участков минерализации межклеточного матрикса (т.е. дифференцировке МСК в остеобласты), росту числа клеток, несущих маркеры пула ГСК в клеточной культуре на 14-е сутки, и увеличению плотности распределения

морфологически распознаваемых кроветворных клеток на 21-е сутки. Вероятно, усиленная остеогенная дифференцировка МСК в присутствии 3D-модельных матриксов, имитирующих минеральное вещество костной ткани, способствует также формированию *in vitro* остеобластных ниш, за счет секреции цитокинов и факторов роста и, возможно, межклеточного взаимодействия с кроветворными клетками.

## Список литературы / References

1. Anthony B.A., Link D.C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells Trends. *Immunol.*, 2014, Vol. 35, no. 1, pp. 32-37.
2. Corselli M., Chin C.J., Parekh C., Sahaghian A., Wang W., Ge S., Evseenko D., Wang X., Montelatici E., Lazzari L., Crooks G.M., Péault B. Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 15, pp. 2891-2901.
3. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 315-317.
4. Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Melashchenko E.S., Todosenko N.M., Khlusova M.Y., Sharkeev Y.P., Komarova E.G., Sedelnikova M.B., Shunkin E.O., Khlusov I.A. Behavioral Changes of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Contact with Synthetic Calcium Phosphates *in vitro*. *Cell Tissue Biol.*, 2018, Vol. 12, no. 2, pp. 112-119.
5. Méndez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., Macarthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N., Frenette P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 2010, Vol. 466, no. 7308, pp. 829-834.
6. Mickiene G., Dalgėdienė I., Zvirblis G., Dapkunas Z., Plikusiene I., Buzavaite-Verteliene E., Balevičius Z., Rukšėnaitė A., Pleckaityte M. Human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)/stem cell factor (SCF) fusion proteins: design, characterization and activity. *PeerJ.*, 2020, Vol. 8, e9788. doi: 10.7717/peerj.9788.
7. Munir H., Ward L.S.C., McGettrick H.M. Mesenchymal stem cells as endogenous regulators of inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2018, Vol. 1060, pp. 73-98.
8. Tasian S.K., Bornhäuser M., Rutella S. Targeting leukemia stem cells in the bone marrow niche. *Biomedicines*, 2018, Vol. 6, no. 1, pii: E22. doi: 10.3390/biomedicines6010022.
9. Terleeva O.P., Sharkeev Yu.P., Slonova A.I., Mironov I.V., Legostaeva E.V., Khlusov I.A., Matykina E., Skeldon P., Thompson G.E. Effect of parameters of microplasma modes and electrolyte composition on characteristics of calcium phosphate coatings on pure titanium for medical use. *Surf. Coat. Technol.*, 2010, Vol. 205, pp. 1723-1729.
10. Tuljapurkar S.R., Jackson J.D., Brusnahan S.K., O'Kane B.J., Sharp J.G. Characterization of a mesenchymal stem cell line that differentiates to bone and provides niches supporting mouse and human hematopoietic stem cells. *Stem Cell Discov.*, 2012, Vol. 2, no. 1, pp. 5-14.
11. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.*, 2007. Vol. 13, no. 7, pp. 791-801.
12. Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W.-G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J.Q., Harris S., Wiedemann L.M., Mishina Y., Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003, Vol. 425, no. 6960, pp. 836-841.

### Авторы:

**Иванов П.А.** — инженер-исследователь Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Юрова К.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

### Authors:

**Ivanov P.A.**, Engineer-Researcher, Centre of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Yurova K.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Хазиахматова О.Г.** — к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Шуплецова В.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Малащенко В.В.** — инженер-исследователь Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Шуныкин Е.О.** — младший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Норкин И.К.** — биолог Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Хлусов И.А.** — д.м.н., профессор кафедры морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск; главный научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Литвинова Л.С.** — д.м.н., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Khaziakhmatova O.G.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Shupletsova V.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Malaschenko V.V.**, Engineer-Researcher, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Shunkin E.O.**, Junior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Norkin I.K.**, Biologist, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Khlusov I.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk; Main Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Litvinova L.S.**, PhD, MD (Medicine), Head, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 17.05.2021  
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021  
Accepted 17.06.2021