

На правах рукописи

Норкин Игорь Константинович

**РЕАКЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В
УСЛОВИЯХ IN VITRO МОДЕЛИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ
ТКАНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЕПАРИНА**

1.5.5. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск 2022

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
профессор кафедры органической
химии ФГАОУ ВО НИ ТГУ
Минобрнауки России

Чурина Елена Георгиевна

Кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией
клеточной иммунологии ФГБНУ
«Институт экспериментальной
медицины»

Кудрявцев Игорь Владимирович

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

Защита состоится __ _____ в __ ч на заседании диссертационного совета 21.2.068.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Регенерация костной ткани (физиологическая и репаративная) является сложноорганизованным процессом восстановления/заживления костной ткани, в реализации которого участвуют клетки-предшественницы, а также эндотелиальные, гемопоэтические, иммунокомпетентные клетки и др. [Gorbet M.B., Sefton M.V., 2004; Holmes D., 2017; Ho-Shui-Ling A. et al., 2018; Labarrere C.A., 2020]. Согласованное действие разных клеток контролируется совокупностью биохимических, физических и механических факторов [Seeman E., 2008], в значительной степени воспроизводящих развитие эндохондральной кости во время эмбриогенеза [Gerstenfeld L.C. et al., 2003; Mussano F. et al., 2017; Ratushnyu A. et al., 2017]. Следует отметить, что при регенерации кости ключевую роль играют многие гомеостатические гены и первичные морфогенетические пути, которые активны во время развития скелета [Phillips A.M., 2005]. Основными участниками процесса регенерации костной ткани, наряду с остеобластами и остеокластами, являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), обладающие способностью к самоподдержанию и дифференцировке *in vivo* в мезодермальном (адипоциты, остеоциты и хондроциты), эктодермальном (нейроциты) и энтодермальном (гепатоциты) направлении [Wang Y. et al., 2012; Ullah I. et al., 2015]. ММСК способны формировать строму различных органов и тканей человека и животных, а также "паренхиму" костной ткани, за счет ремоделирования регулируемого экстрацеллюлярного трехмерного матрикса (ЭЦМ) [Jiang W., Xu J., 2019]. Естественными компонентами ЭЦМ являются гликозаминогликаны, в том числе, гепариноподобные молекулы и гепарин, которые участвуют во многих сигнальных путях и играют важную роль в различных биологических процессах в норме и при патологии [Litvinova L. et al., 2020], включая пролиферацию клеток и воспаление. Гепарин обнаружен в межклеточном веществе, тканях легких, печени, сердца и обычно хранится в секреторных гранулах тучных клеток, высвобождаясь в сосудистую сеть в местах повреждения тканей, что указывает на его участие в защите от проникновения бактерий и чужеродных элементов [Nader H.B. et al., 1999; Susanto A. et al., 2019]. Однако, несмотря на большое количество работ, посвященных участию гепарина в процессах остеогенеза, клеточные и молекулярные аспекты его влияния на участников регенерации кости, в т.ч. ММСК, остаются до конца неизученными [Paiardi G. et al., 2021; Mese K. et al., 2021; Maccarana M. et al., 2022].

Степень разработанности темы. Ранее сообщалось, что гликозаминогликаны, в частности, гепарин, являются мощными индукторами активации остеогенных сигнальных путей. Ling L. и коллеги (2010) продемонстрировали, что гепарин, за счет физического взаимодействия с лигандом Wnt3a, активирует Wnt-сигнальный путь, увеличивая, таким образом, дифференцировку ММСК в сторону остеобластов [Ling L. et al., 2010]. В других работах показано, что гепарин способствует остеогенной дифференцировке стромальных клеток костного мозга человека, и снижает возможность их адипогенной конверсии [Simann M. et al., 2015]. Выявлено, что гепарин при гиперфизиологических дозах может улучшать доставку BMP-2 *in vivo*, способствуя заживлению больших костных дефектов [J. Wang J. et al., 2022]. Стромальные клетки костного мозга, выращенные на поверхности, обработанной гепарином, демонстрировали повышенную активность щелочной фосфатазы (ЩФ) и минерализацию [Hempel U. et al., 2014]. Гепарин также участвует в развитии сосудистых клеток, что весьма важно для восстановления костных дефектов вследствие необходимого кровоснабжения в новообразованной ткани [Dewey M. et al., 2021]. Добавление гепарина (0,61 МЕ/мл) в культуральную среду способствует пролиферации и сохранению жизнеспособности ММСК [Susanto A. et al., 2019]. В экспериментальных работах *in vitro* выявлено, что гепарин оказывает дозозависимые эффекты на остеобластоподобные клетки Saos-2: его ингибирующее действие проявляется при более высоких концентрациях (≥ 5 мкг/мл), стимулирующее - при

более низких (5–500 нг/мл) [Hausser H., Brenner R., 2004]. В то же время следует отметить, что наиболее широко используемый в медицинской практике нефракционированный гепарин (НФГ) ограничивает нормальное образование фибринового сгустка *in vivo*, что замедляет миграцию и адгезию ММСК, нарушая процессы формирования костной мозоли, в связи с чем процессы остеointеграции имплантата и регенерации поврежденной костной ткани могут быть нарушены [Cuker A. et al., 2018]. Становится очевидным, что расшифровка механизмов, определяющих *in vivo* и *in situ* реакции ММСК на структурные и гуморальные сигналы микроокружения, в контексте изучения механизмов остеогенеза, является одной из ключевых задач современной физиологии. ММСК способны секретировать разнообразные факторы: цитокины, хемокины, про- и противовоспалительные цитокины, уровень продукции которых варьируется в зависимости от тканевого источника [Шахпазян Н.К. и др., 2012]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что специфическое тканевое микроокружение ММСК контролирует их секреторную активность. Наиболее физиологическим раздражителем с остеогенным действием, имитирующим структурно-функциональное состояние минерального вещества регенерирующей костной ткани, а также хорошо изученным на протяжении нескольких десятков лет, является микродуговое кальцийфосфатное покрытие на титановых подложках [Khlusov I.A. et al., 2018]. Так, основной неорганический компонент в костной ткани, фосфат кальция, обладает присущей ему биосовместимостью при применении в качестве биоматериалов в организме человека [Anselme K., 2000], оказывая прямое и существенное влияние на возможности и функции клеток, в том числе, ММСК [Yang Y. et al., 2017; Meng J., 2017]. Участие эндогенного гепарина в модуляции клеточных ответов в норме и при патологии [Susanto A. et al., 2019], позволяет предположить, что при введении экзогенного гепарина после имплантации и эндопротезирования, он может влиять на остеointеграцию медицинских изделий, регулируя эффективность остеогенеза. Таким образом, предпринятое нами направленное изучение эффектов физиологических доз гепарина в присутствии TiКФ-образцов на ММСК-ЖТ является актуальным и перспективным в контексте изучения фундаментальных механизмов регенерации костной ткани, регуляции жизнедеятельности стволовых клеток, а также для эффективного развития тканевой инженерии и регенеративной медицины. В связи с вышесказанным, **целью исследования** явилось изучение морфофункциональных реакций мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в условиях дистантного трехмерного *in vitro* моделирования регенерации костной ткани в присутствии прямого антикоагулянта (гепарина).

Задачи исследования:

1. Дать сравнительную характеристику молекулярных и клеточных параметров (жизнеспособность, миграция, адгезия, пролиферация, экспрессия генов остеодифференцировки, цитокинпродуцирующая активность) ММСК-ЖТ в *in vitro* условиях 2D- и 3D-моделирования регенерации костной ткани в присутствии гепарина (1 МЕ/мл).
2. Оценить взаимосвязь молекулярных и клеточных параметров ММСК-ЖТ с процессами остеодифференцировки в *in vitro* условиях 2D- и 3D-моделирования регенерации костной ткани в присутствии гепарина (1 МЕ/мл).
3. Определить основные молекулярные и клеточные механизмы регенерации костной ткани в условиях дистантного *in vitro* 3D-культивирования ММСК-ЖТ человека в присутствии гепарина (1 МЕ/мл).

Положения, выносимые на защиту

1. Присутствие гепарина (1 МЕ/мл) в двумерной культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) стимулирует образование минерализованного межклеточного матрикса (на 21 сутки) посредством увеличения (в сравнении с 2D контролем и 3D моделью с гепарином) уровня

экспрессии генов остеодифференцировки (*ALPL*, *BMP2*, *BMP6*) и адгезии (*ген субъединицы интегрина VLA-4 - CD49d*), снижения числа CD73-, CD90-, CD105-позитивных клеток, а также доли гемопоэтических клеток [CD45,34,14,20]⁺, на фоне низкой продукции ММСК-ЖТ (за исключением факторов - VEGF и IL-6) ростовых факторов, в том числе, стимулирующих гемопоэз (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3), молекул с провоспалительной (TNF α , TRAIL) и хемоаттрактантной (SDF-1 α , MCP-1, IL-8) активностью.

2. Дифференцировка ММСК-ЖТ в продуцирующие минерализованный костный матрикс остеобласты, опосредованная комбинированным 14-21-суточным воздействием ТiКФ-образцов (*посредством продуктов биodeградации*) и гепарина (1 МЕ/мл), сопровождается снижением миграции и пролиферации клеточной культуры (*в сравнении с 2D моделью с гепарином*), увеличением (*в сравнении с 2D контролем*) экспрессии генов остеодифференцировки (*ALPL*, *BMP2*, *BMP6*, но не *RUNX2*) и гена субъединицы интегрина *VLA-4 (CD49d)*, снижением (*в сравнении с 2D моделью с гепарином*) числа клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры стволовости (CD73, CD90, CD105), ростом [CD45,34,14,20]⁺ гемопоэтических клеток, на фоне высокой жизнеспособности культуры.

3. В 14-дневной 3D модели культивирования с гепарином (1МЕ/мл) прирост содержания ростовых факторов (HGF, M-CSF, SCF, LIF, IL-3 и VEGF), хемокинов (SDF-1 α , MCP-1, IL-8), а также провоспалительных молекул (IL-6, TRAIL) в супернатантах культур ММСК-ЖТ во взаимосвязи с уровнем гемопоэтических клеток в культуре, опосредует более эффективную (*в сравнении с другими моделями*) минерализацию межклеточного матрикса на 21 сутки культивирования.

Научная новизна. Впервые выявлено, что формирование минерализованного межклеточного матрикса, характерного для культур остеобластов, в 14-21-суточной двумерной культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека с гепарином (1 МЕ/мл), связано с увеличением уровня экспрессии генов остеодифференцировки (*ALPL*, *BMP2*, *BMP6*) и адгезии (*ген субъединицы интегрина VLA-4 - CD49d*), напротив, со снижением числа клеток, несущих маркеры стволовости (CD73, CD90, CD105), а также доли гемопоэтических клеток [CD45,34,14,20]⁺, на фоне низкого содержания (за исключением факторов - VEGF и IL-6) в супернатантах клеточных культур ростовых факторов, в том числе, стимулирующих, молекул с провоспалительной и хемоаттрактантной активностью. Приоритетными являются данные, свидетельствующие об ингибирующем действии физиологической концентрации гепарина (1 МЕ/мл) на миграционную активность ММСК-ЖТ человека, как в присутствии нановзвеси ГАП (1 мг/мл), так и без нее. Впервые установлено, что гепарин (1 МЕ/мл) обладает индуцирующим эффектом на пролиферативную активность ММСК-ЖТ, тогда как при сокультивировании ММСК-ЖТ с гепарином (1 МЕ/мл) и взвесью наночастиц ГАП (1 мг/мл), пролиферативная активность клеточной культуры достоверно снижается. Впервые обнаружено, что в трёхмерной модели культивирования с гепарином (1 МЕ/мл), ММСК-ЖТ человека более эффективно (*в сравнении с 2D моделью с гепарином и 3D моделью*) дифференцируются в остеобласты, что подтверждается высокими значениями суммарной площади минерализации межклеточного матрикса на пластике; установлено, что выявленные изменения сопровождаются снижением числа клеток, экспрессирующих на мембране маркеры стволовости (CD73, CD90, CD105), ростом (*в сравнении с 2D контролем, но ниже, чем в 2D контроле с гепарином*) уровня экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *BMP2*, *BMP6*) и гена субъединицы интегрина *VLA-4 (CD49d)*, повышением доли клеток с фенотипом гемопоэтических [CD45,34,14,20]⁺, на фоне сохранения высокой жизнеспособности клеточной культуры. В работе приведены убедительные данные о том, что увеличение продукции ММСК-ЖТ человека ростовых молекул, в том числе,

гемопозитических факторов, хемокинов и провоспалительных цитокинов, оказывает позитивное модулирующее влияние на эффективное формирование в трёхмерной модели дистантного *in vitro* культивирования с гепарином, прообраза системы "кость/костный мозг", что подтверждается многочисленными взаимосвязями исследуемых факторов с экспрессией генов остеодифференцировки, содержанием гемопозитических клеток и клеток, несущих маркеры стволовости (CD73, CD90, CD105).

Теоретическая и практическая значимость работы. Выявленные нами общие закономерности и особенности действия гепарина, в регуляции морфофункционального состояния мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях *in vitro* сокультивирования с трехмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань, позволят расширить существующие **теоретические знания** о физиологических механизмах остеointеграции медицинских изделий и позволят выявить таргетные мишени изучаемого процесса регенерации костной ткани, в целом. Изучение фундаментальных физико-химических и биологических процессов, лежащих на границе раздела имплантат/клетка, в присутствии прямого антикоагулянта (гепарина), послужит фундаментальной основой для понимания и разработки принципиально новой тактики ведения пациентов хирургического профиля с высоким риском тромбозов в послеоперационном периоде.

Практическая значимость исследования обусловлена тем, что полученные нами знания могут лечь в основу разработки разных видов биodeградируемых покрытий, используемых в качестве модуляторов физиологической и репаративной регенерации костной ткани, а также позволят выявить оптимальные условия реализации остеогенного потенциала материалов медицинского назначения, станут базисом для создания нового класса имплантатов с оптимальными физико-химическими и механическими свойствами. Кроме того, полученные результаты позволят разрабатывать новые протоколы масштабного культивирования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, для исследования физиологических механизмов остеointеграции и восстановления костной ткани на границе кость/искусственный материал, более приближенные к условиям послеоперационного восстановления поврежденной ткани *in vivo*. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе в Высшей школе медицины и Высшей школе живых систем ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

Методология и методы диссертационного исследования

В соответствии с поставленными задачами выбраны высокоинформативные методы исследования, выполненные на базе современного высокотехнологического Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта (г. Калининград). В качестве материала исследования использовали культуру мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани человека (ММСК-ЖТ), сокультивируемых с гепарином (1 МЕ/мл) в присутствии трёхмерного матрикса из титанового сплава с кальцийфосфатным покрытием (КФ).

Основные методы исследования:

1. Выделение ММСК из жировой ткани условно здорового донора.
2. Культуральные методы исследования *in vitro*.
3. Оценка уровня экспрессии мРНК генов (*ALPL*, *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*, *CD49d*) с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).
4. Оценка фенотипических характеристик культуры ММСК-ЖТ человека и клеточной жизнеспособности методом проточной цитометрии.
5. Исследование дифференцировки ММСК-ЖТ человека методом дифференциального цитологического окрашивания

6. Оценка содержания факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в супернатантах клеточных культур ММСК-ЖТ человека методом проточной цитофлуориметрии.
7. Оценка миграционного и пролиферативного потенциала ММСК-ЖТ человека с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP (Roche, Швейцария).
8. Определение общей площади трёхмерных островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) в культурах ММСК-ЖТ человека методом компьютерной морфометрии.
9. Статистический анализ данных.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обоснована достаточным объёмом экспериментального материала с использованием современных высокотехнологичных методов исследования (проточная цитофлуориметрия, культуральные методы исследования, полимеразно-цепная реакция в режиме реального времени, цитологическое окрашивание, оптическая микроскопия, компьютерная морфометрия) и современного оборудования, а также адекватного выбора критериев для статистической обработки полученных результатов. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на 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, 1-7 октября 2020); IV Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва, 20-23 ноября 2019); «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (г. Томск, 13–16 сентября 2021), «Вопросы морфологии XXI века: инновационные технологии в исследованиях, диагностике и преподавании» (г. Санкт-Петербург, 22-23 сентября 2022. 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), Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-2452.2019.4), Государственного задания (№ FZWM-2020-0010), Программы стратегического академического лидерства ПРИОРИТЕТ 2030 в СибГМУ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 9 полнотекстовых статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, 4 статьи и тезиса в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа проиллюстрирована 17 рисунками и 8 таблицами. Библиографический указатель включает 303 источников (14 отечественных и 289 иностранных).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования, а также проведении эксперимента. Результаты получены, проанализированы и обобщены в положениях и выводах лично автором.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования были использованы мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), выделенные из липоаспирата подкожной жировой ткани (ЖТ) человека. Работа с культурами ММСК-ЖТ

проводилась с соблюдением всех биоэтических норм и в соответствии с одобрением комиссии по этике Балтийского федерального университета им. И. Канта: №1 от 28.02.2019 г. Предварительно было получено информированное согласие условно здоровых доноров на участие в исследовании и использовании биообразцов жировой ткани. Цикл экспериментальных работ был проведен на базе Центра иммунологии и клеточных биотехнологий при БФУ им. И. Канта (директор центра – доктор медицинских наук, Литвинова Л.С.).

Дизайн экспериментальной работы представлен на **рисунке 1**.

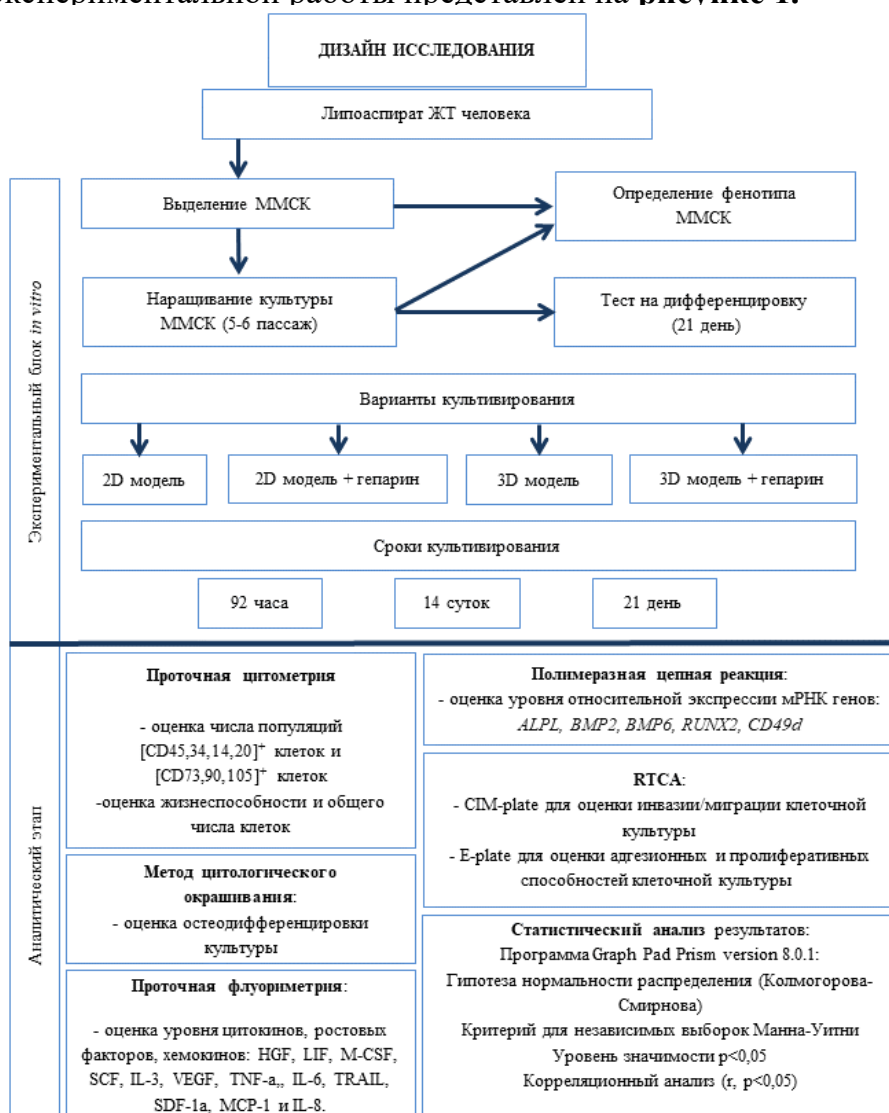


Рисунок 1 - Блок-схема дизайна эксперимента

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

В качестве материала для имитации реакции ММСК-ЖТ человека на минеральную часть межклеточного вещества был использован коммерчески чистый титан с двусторонним покрытием из фосфатов кальция (TiКФ); общий размер образцов составлял $10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$ (стороны квадрата; толщина). Содержание составных элементов в весовых процентах: 99.58 Ti, 0.12 O, 0.18 Fe, 0.07 C, 0.04 N, 0.01 H. Образцы имплантатов с микродуговым КФ покрытием были изготовлены в электролите из наночастиц гидроксиапатита (ГАП) в институте физики прочности и материаловедения СО РАН (Томск). Порошок синтетического ГАП (диаметр частиц

40–100 нм) получали механохимическим способом, описанным ранее [Chaikina M. et al., 2004]. Индекс шероховатости (Ra) КФ-поверхности титановых образцов был измерен в соответствии с ГОСТ 2789-73 на профилометре Talysurf 5–120 (Taylor Hobson Ltd., Великобритания) и находился в диапазоне Ra=2-3 мкм, что соответствовало физиологической модели регенерации костной ткани. В качестве прямого антикоагулянта в данном исследовании был выбран гепарин (Белмедпрепараты, Республика Беларусь), разработанный для оптимизации антикоагулянтного эффекта [Banik N. et al., 2021]. Дозы гепарина, используемые в эксперименте (1 МЕ/мл / 8 мкг/мл), были выбраны с критерием минимального влияния на жизнеспособность культуры ММСК-ЖТ человека, а также соответствовали физиологическому действию в организме (до 100 мг на условные 70 кг веса человека), согласно данным литературы [Юшков Б. и др., 1994].

Стромально-васкулярную фракцию с примесью эндотелиальных клеток, перицитов и гладкомышечных клеток получали методом, описанным ранее [Zuk P. et al., 2001]. Выделенную ткань гомогенизировали механическим способом в небольшом количестве среды DMEM/F12(1:1) (Gibco Life Technologies, США), затем ферментировали раствором коллагеназы 1 типа (SigmaAldrich, США) в течение 1 часа при 37 °С в орбитальном термощейкере со скоростью вращения 600 об/мин (0,4g) («Biosan», Литва). Клеточную взвесь ресуспендировали и вносили в культуральный флакон (площадь -75 см² («Eppendorf», Германия), культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США). Содержание эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Sigma-Aldrich, США) составляло 10%, L-глутамина (Sigma-Aldrich, США) - 280 мг/л, гентамицина (Invitrogen, Великобритания) - 50 мг/л. Стромально-васкулярную фракцию пересеивали 4 раза до достижения клеточной конfluence для увеличения популяции культуры ММСК. Питательную среду меняли каждые 3-4 дня. В эксперименте использовали адгезирующую к пластику культуру после 5 пассажа. Далее нами была проведена дифференцировочная и фенотипическая идентификации принадлежности выделенного пула клеток к культуре ММСК согласно рекомендациям интернационального сообщества по клеточной терапии (ISCT) и интернациональной федерации жировой терапии и науки (IFATS) [Dominici M. et al., 2006; Bourin P. et al., 2013].

Культивирование ММСК-ЖТ человека проводилось в соответствии с задачами исследования, с соблюдением основных условий культивирования клеточной культуры: при 37°С, в 100% влажной атмосфере, в присутствии 5% CO₂. Смену среды проводили каждые 3-4 суток. Для оценки морфофункционального состояния клеток, культивируемых в присутствии гепарина и остеозамещающих материалов, было сформировано 4 экспериментальные группы: 2D-контрольная группа ММСК-ЖТ в полной питательной среде (далее 2D модель); 2D-модель культивирования с гепарином в концентрации 1 МЕ/мл (далее 2D модель_гепарин); 3D-модель ММСК-ЖТ с имплантатом (далее 3D модель); 3D-модель культивирования с имплантатом и гепарином в концентрации 1 МЕ/мл (далее 3D модель_гепарин). Для регистрации уровня живых и мертвых клеток в исследуемых клеточных культурах, использовали метод проточной лазерной цитометрии, с использованием проточного цитометра «MACSQuantAnalyzer» («Miltenyi Biotec», Германия). Для анализа иммунофенотипа культур ММСК-ЖТ человека после культивирования в разных условиях (2D модель, 2D модель_гепарин, 3D модель и 3D модель_гепарин), проводили детекцию основных маркеров стромальных (CD105, CD73, CD90) и гемопоэтических (CD45, CD14, CD20, CD34) клеток, методом проточной цитофлуориметрии использованием набора MSC Phenotyping Kit human (Miltenyi Biotec, Германия). Для оценки уровня относительной экспрессии мРНК генов (*RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*, *ALPL* и *CD49d*) в культуре клеток по окончании срока культивирования (14 суток) из полученных нами образцов выделяли тотальную РНК с использованием реагента Extract RNA kit (Евроген, Россия). Далее проводили реакцию обратной транскрипции с целью

получения ДНК-матрицы использованием реакционной смеси, содержащей РНК-матрицу и праймер oligo(dT)23-primer («Beagle», Россия). Определение уровня относительной экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя реагенты qPCRmixHS («Евроген», Россия) и специфические зонды TaqMan и праймеры (10пМ) («Beagle», Россия). Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации (<https://toptipbio.com/pfaffl-method-qpcr/>).

Последовательность олигонуклеотидных праймеров: используемых в эксперименте:

<i>GAPDH</i>	F: 5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACA -3' R: 5'-ATGACAAGCTTCCCGTTCTC -3' FAM-5'-CAAATTCCATGGCACCGTCAAGGC -3'- BHQ1
<i>ALPL</i>	F: 5'-GGGAAATCTGTGGGCATTGT-3' R: 5'-GAGTACCAGTCCCGGTCAGC-3' 5'- FAM-ACCACGAGAGTGAACCATGCCA-BHQ1-3'
<i>BMP2</i>	F: 5'-ACGAGGTCTTGAGCGAGTT-3' R: 5'-GACCTGAGTGCCTGCGATAC-3' 5'- FAM-CTGAAACAGAGACCCACCCAGCA-BHQ1-3'
<i>BMP6</i>	F: 5'- TTACAGGAGCATCAGCACAG-3' R: 5'- GGAGTCACAACCCACAGATT-3' 5'- FAM- CCTCAGAAGAAGGCTGGCTGGAAT-BHQ1 -3'
<i>RUNX2</i>	F: 5'- CCAGAAGGCACAGACAGAAG-3' R: 5'- GATGAGGAATGCGCCCTAAA-3' 5'- FAM-AGTTTGTCTCTGACCGCCTCAGT-BHQ1-3'
<i>CD49d</i>	F: 5'-GTA CTTTGGAGCTTCTGTCTGT-3' R: 5'-TCTTCCTTCCTCTCTGATGGT-3' 5'- FAM - TGGACCTCAATGCAGATGGCTTCT-BHQ1-3'

Определение количественного уровня биологически активных молекул (HGF, M-CSF, SCF, IL-3, VEGF, TNF- α , IL-6, TRAIL, SDF-1a, MCP-1 и IL-8) проводили в супернатантах ММСК-ЖТ спустя 14 суток культивирования с помощью метода проточной флуориметрии, на двухлучевом лазерном автоматическом анализаторе (Bio-Plex® 200 Systems, «Bio-Rad», США), с использованием коммерческой тест-системы (Bio-Plex Pro Human Cytokine 48-plex Assay, «Bio-Rad», США). По истечении 21 дня культивирования исследуемые культуры фиксировали в парах формалина, окрашивали 2% водным раствором ализаринового красного S (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции фирмы-производителя для оценки минерализации межклеточного матрикса. Микрофотографии окрашенных культур получали с использованием лабораторного биологического микроскопа для фазового контраста в комплекте с программным обеспечением («Olympus Corporation», Филиппины). Морфометрическое исследование площади окрашенных областей проводили с использованием программного обеспечения Image-J Software (National Institutes of Health, США) согласно алгоритму, представленному в руководстве [Broeke J. et al., 2015]. Оценку миграционной способности ММСК-ЖТ через поры в мембране (инвазия), имитирующие поры кровеносных сосудов, проводили с использованием электродной системы непрерывного видеонаблюдения xCELLigence® RTCA DP (ACEA Biosciences Inc., США), 16-луночный СИМ-планшет.

Для оценки пролиферативной активности - 16-луночный Е-планшет, представляющий собой систему, обеспечивающую непрерывное количественное считывание скорости пролиферации клеток, их количества, размера/формы и качества прикрепления к субстрату. Статистическая обработка полученных результатов была проведена с использованием методов статистического описания, а также методов

проверки статистических гипотез, с помощью программного обеспечения Prism 8.0.1 (Graphpad, USA). Нормальность распределения данных оценивали согласно гипотезе Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса для множественного анализа выборок (от трех и более) с использованием критерия Данна. Корреляционный анализ для подтверждения взаимосвязи между исследуемыми показателями проводили путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [Кремер Н., 2007].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) обладают способностью к самообновлению и возникновению, по крайней мере, одного типа высокодифференцированных потомков [Watt F., Hogan B., 2000]. ММСК являются наиболее перспективными клетками для регенерации и восстановления костной ткани, благодаря их остеогенному потенциалу [Bianco P. et al., 2001]. Остеогенная дифференцировка ММСК тонко регулируется и координируется механическими и молекулярными сигналами из внеклеточной среды и инициирует сложные пути на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, которые во многом остаются неизученными [Chen F. et al., 2016; Deng P. et al., 2016]. Известно, что топография/пространственная организация искусственного матрикса на поверхности имплантата регулирует направленность дифференцировки ММСК, путем модуляции клеточных процессов и изменения структурного состояния цитоскелета [Prowse P. et al., 2013]. Ранее сообщалось, что гликозаминогликаны, в частности, гепарин, являются мощными индукторами активации остеогенных сигнальных путей [Wang J. et al., 2022]. Однако, несмотря на детальное изучение процессов остеointеграции *in vitro* и *in vivo*, аспекты совместного влияния остеогенных искусственных матриксов, в частности, КФ-покрытия, имитирующего регенерирующую костную ткань и прямых антикоагулянтов (в частности, гепарина) на механизмы формирования остеобластных ниш, а также регенерацию костной ткани, в целом, до конца остаются не выявленными.

Нами было выявлено, что *in vitro* сокультивирование (в течение 14 дней) ММСК-ЖТ в разных условиях значимо не отражалось на жизнеспособности клеточных культур. Полученные нами результаты, в целом, сопоставимы с данными исследования, проведенного Li Y. et al. (2016), демонстрирующего отсутствие влияния гепарина на жизнеспособность ММСК-ЖТ *in vitro* [Li Y. et al., 2016]. В ходе проведенного эксперимента (в течение 92 часов) с помощью электродной системы RTCA было выявлено, что наночастицы ГАП в присутствии гепарина (1 МЕ/мл) оказывают негативное влияние на миграционную способность ММСК-ЖТ, по сравнению с 2D моделью с гепарином (1 МЕ/мл), что было продемонстрировано снижением уровня ИКМ в исследуемых группах ($p < 0,05$) (рис. 2). Ранее нами было показано, что гепарин в концентрациях, превышающих терапевтические (1,3; 13; 130; 260 МЕ/мл), увеличивал миграционную способность ММСК-ЖТ при их сокультивировании *in vitro* в 2D- и 3D-культурах [Норкин И. и др., 2021]. Кроме того, полученные нами данные позволяют сделать вывод о снижении пролиферативной способности ММСК-ЖТ в 3D модели в присутствии гепарина (1 МЕ/мл) (рис. 3). Нами было выявлено индуцирующее влияние гепарина (1 МЕ/мл) на клеточную пролиферацию в 2D модели культивирования: индекс клеточной пролиферации (ИКП) в этой группе спустя 92 часа от начала эксперимента был выше, чем таковой в 2D контрольной модели. Эти результаты согласуются с данными, предполагающими, что гепарин может влиять на пролиферацию и функциональную активность ММСК [Laner-Plamberger S. et al., 2015].

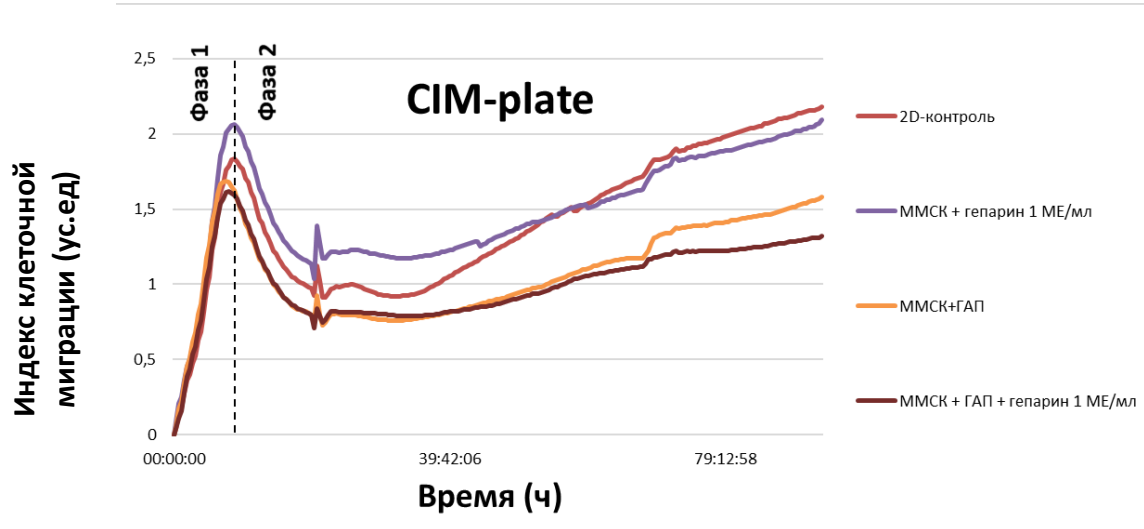


Рисунок 2 - Кривые клеточной миграции ММСК-ЖТ человека во всех группах исследования в электродной системе RTCA (92-ч мониторинг). Фаза 1 - фаза линейного роста; Фаза 2 - фаза логарифмического роста ИКМ

В целом, комбинированное влияние гепарина и ГАП негативно отражается на пролиферативной способности ММСК-ЖТ. Логичным представляется тот факт, если ММСК утрачивает способность к делению и миграции (при сохранении жизнеспособности), значит клетка должна активировать процессы дифференцировки и созревания, заложенные в ее программе [Aerts F., Wagemaker G., 2006].

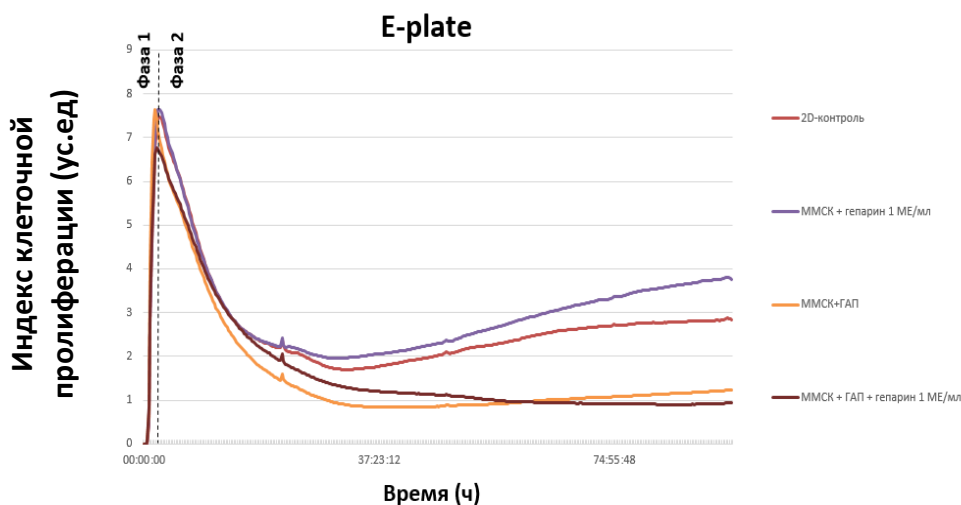


Рисунок 3 - Кривые клеточной пролиферации ММСК-ЖТ человека во всех группах исследования в электродной системе RTCA (92-ч мониторинг). Фаза 1 - фаза линейного роста; Фаза 2 - фаза логарифмического роста ИКП

В данном случае, в контексте настоящего эксперимента, определяющими факторами клеточного поведения ММСК-ЖТ могут быть, в частности, ионы Ca^{2+} и молекулы гепарина. Известно, что ионы кальция способны стимулировать минерализацию матрикса через рецептор, чувствительный к кальцию, что приводит к ограничению подвижности клеток и дифференцировке ММСК-ЖТ в остеобласты [Theman T., Collins M., 2009]. Доказательством вышесказанному явились выявленные нами следующие признаки дифференцировки ММСК-ЖТ в остеобласты. Так, одним

из пунктов, относящихся к минимальным морфологическим критериям принадлежности к ММСК, является наличие позитивных мембранных маркеров - CD73, CD90 и CD105 и отсутствие мембранных молекул кроветворных клеток - CD45,34,20,14 [Dominici M. et al., 2006; Bourin P. et al., 2013]. Мы предполагаем, что изменение (снижение) экспрессии молекул CD90, CD73 и CD105 на клеточной мембране ММСК-ЖТ может играть решающую роль в модуляции дифференцировки ММСК-ЖТ в сторону остеобластов. Наибольшее снижение (относительно всех исследуемых групп) числа клеток, экспрессирующих мембранные дифференцировочные молекулы ММСК - CD73, CD90 и CD105, регистрировалось в 3D модели культивирования с гепарином (табл. 1). В исследовании Moraes D.A. (2016) было показано, что снижение уровня экспрессии CD90 усиливает дифференцировку ММСК в остеогенном и адипогенном направлениях [Moraes D. et al., 2016]. Снижение экспрессии эндоглина (CD105) на поверхности ММСК идентифицирует данную культуру клеток, как с усиленной остеогенной дифференцировкой [Levi B. et al., 2011]. Kimura K. et al. (2021) также сообщают, что ММСК с положительной экспрессией CD73 на своей поверхности демонстрируют повышенную стволовость и потенциал к остеогенной дифференцировке *in vitro* и *in vivo* [Kimura K. et al., 2021]. Интересно отметить, что на фоне утраты экспрессии дифференцировочных маркеров ММСК-ЖТ в 3D моделях с гепарином (1 МЕ/мл) и без него, регистрировалось значительное (в 3 и 6 раз, соответственно, $p < 0,05$) повышение содержания клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтики [CD45,34,14,20]⁺, по сравнению с 2D культурами с гепарином (1 МЕ/мл) и без него (табл. 1). Известно, что гемопоэтические очаги возникают в тесной связи с костной и хрящевой тканями [Assis-Ribas T. et al., 2018].

Таблица 1 - Анализ фенотипического состава культур ММСК-ЖТ человека в различных условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина, Ме (Q1 - Q3) (срок культивирования - 14 дней)

Группы исследования / Показатели (%)	[CD90] ⁺	[CD105] ⁺	[CD73] ⁺	[CD45,34,14,20] ⁺
2D модель n = 6	92,83 (92,02 - 93,94)	91,52 (91,21 - 92,42)	84,89 (83,84 - 85,99)	0,41 (0,17 - 0,52)
2D модель_гепарин n = 6	81,26 (79,64 - 85,62) p0<0,05	80,31 (80,11 - 82,73) p0<0,05	71,51 (68,74 - 72,81) p0<0,05	0,45 (0,28 - 0,67)
3D модель n = 6	85,32 (82,99 - 87,07) p0<0,05	87,15 (85,37 - 92,23) p1<0,05	82,11 (79,63 - 85,86) p0,1<0,05	2,42 (1,98 - 2,85) p0,1<0,05
3D модель_гепарин n = 9	71,07 (70,36 - 73,25) p0,1,2<0,05	71,64 (70,18 - 72,08) p0,1,2<0,05	63,63 (62,87 - 63,73) p0,1,2<0,05	1,24 (0,82 - 1,74) p0,1,2<0,05

Примечание: здесь и в таблицах: **2-4.**

p0<0,05 – достоверные различия с 1 группой (2D модель);

p1<0,05 – достоверные различия со 2 группой (2D модель_гепарин);

p2<0,05 – достоверные различия с 3 группой (3D модель);

n – число наблюдений (образцов) в каждой группе исследования

Важная роль ММСК, как компонента гемопоэзиндуцирующего микроокружения, состоит в обеспечении выживаемости гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), поддержании их в состоянии покоя или дифференцировки, репарации

тканевых повреждений, за счёт секреции факторов роста, межклеточного взаимодействия и продукции матричных структурных белков [Charman J., Zhang Y., 2020]. Кроме того, из ГСК формируются остеокласты, которые являются важнейшими компонентами физиологического процесса костного ремоделирования в фазу резорбции [Zaidi M., 2007]. Полученные нами данные о снижении числа клеток, экспрессирующих поверхностные дифференцировочные маркеры (CD90, CD105, CD73), а также увеличение числа гемопоэтических клеток, опосредованное совместным действием матрикса с КФ покрытием и гепарина (1 МЕ/мл), могут свидетельствовать об утрате стволового состояния культуры ММСК-ЖТ и приобретении ею состояния, более восприимчивого к дифференцировке в остеобласты. Далее нами был проведен анализ дистантного влияния ТiКФ-образцов, имитирующих минеральное вещество регенерирующей костной ткани, в присутствии/отсутствии физиологических доз гепарина (1 МЕ/мл), на уровень относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки и формирование участков/узлов минерализации межклеточного матрикса в культурах ММСК-ЖТ по истечении 21-суток культивирования. Результаты по оценке уровня экспрессии мРНК генов ранней остеодифференцировки - *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6* и *ALPL* демонстрировали наиболее высокие цифры в 2D модели с гепарином (1 МЕ/мл), относительно других групп (табл. 2). В экспериментальных 3D моделях с гепарином и без него изучаемые показатели были значимо ниже значений, полученных в 2D модели с гепарином, но превышали (за исключением экспрессии гена *RUNX2*) показатели 2D контроля. Известно, что *RUNX2* контролирует развитие скелета и дифференцировку остеобластов за счет увеличения экспрессии ряда остеодифференцировочных генов [Komori T., 2005]. Кроме того, *RUNX2* индуцирует активность щелочной фосфатазы (*ALPL*) и минерализацию матрикса в мезенхимальных и остеобластных клетках *in vitro* [Harada H. et al., 1999]. В 3D модели исследования с гепарином уровень относительной экспрессии гена *BMP2* статистически значимо увеличивался относительно 2D-контроля (табл. 2). Данный факт может свидетельствовать в пользу достаточного количества продукта мРНК данного гена в 3D модели с гепарином в связи с тем, что гепарин за счет физического взаимодействия с антагонистами белка *BMP2* увеличивает его активность, и, соответственно, положительно влияет на процесс остеодифференцировки [Kanzaki S. et al., 2011]. *BMP6*, в свою очередь, является костным морфогенетическим белком, проявляющим значительную остеогенную активность. У мышей с делецией гена *BMP6* размер длинных костей был уменьшен, а процесс окостенения грудины занимал больше времени [Perry M. et al., 2008]. В пользу однозначной дифференцировки ММСК-ЖТ в остеобласты также свидетельствует выявленный нами рост уровня экспрессии гена щелочной фосфатазы (*ALPL*) в 14-дневных культурах ММСК-ЖТ в 2D модели с гепарином, и в меньшей степени, в 3D моделях с гепарином и без него (табл. 2). *ALPL* является маркером костной ткани, экспрессия которого стимулируется обработкой морфогенетическим белком-2 (*BMP2*) [Kim Y. et al., 2004]. Выявлено, что индуктором экспрессии гена *ALPL* также являются ионы Ca^{2+} , образующиеся при деградации биоматериала [Tian T. et al., 2019] и запускающие дифференцировку ММСК в остеобласты через экспрессию кальций-связывающих протеинов [Carlier A. et al., 2011]. Тем не менее, интерпретируя полученные результаты в 2D- и 3D моделях с гепарином (1 МЕ/мл), необходимо отметить, что гепарин, связываясь с различными внеклеточными молекулами, проявляет множество типов биологической активности, играя ключевую роль в метаболизме костной ткани.

Таблица 2 - Уровни относительной экспрессии генов в ММСК-ЖТ ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 14 суток), Ме (Q1 - Q3)

Целевой ген, усл.ед.	Группы исследования			
	2D модель n = 6	2D модель_гепарин n = 6	3D модель n = 6	3D модель_гепарин n = 9
	1	2	3	4
<i>RUNX2</i>	1,09 (0,57 – 1,52)	2,41 (1,73 – 3,23) p<0,05	1,16 (0,42 – 2,29)	1,54 (1,32–2,85)
<i>BMP2</i>	0,94 (0,52 – 1,25)	4,05 (3,21 – 5,71) p<0,05	1,67 (1,55 – 3,21) p0,1<0,05	1,92 (1,45 – 2,86) p0,1<0,05
<i>BMP6</i>	0,37 (0,26 – 0,64)	2,08 (0,98 – 3,59) p<0,05	0,44 (0,29 – 0,64) p0,1<0,05	1,25 (1,11 – 1,58) p0,2<0,05
<i>ALPL</i>	0,37 (0,26 – 0,66)	6,23 (5,29 – 8,51) p<0,05	1,78 (1,42 – 2,51) p0,1<0,05	2,75 (2,37 – 4,87) p0,1,2<0,05
<i>CD49d</i>	0,43 (0,29 – 0,46)	4,89 (3,29 – 6,86) p<0,05	1,96 (1,87 – 3,55) p0,1<0,05	1,72 (1,68 – 3,76) p0,1<0,05

Так, было показано влияние гепарина на Wnt-сигнальные пути и другие факторы роста, которые могут регулировать Wnt-зависимую пролиферацию и дифференцировку остеобластов. Так, через активацию BMP2, гепарин опосредованно регулировал уровни RUNX2 и, соответственно, продукцию и активность щелочной фосфатазы (ALPL), тем самым, управляя ранней дифференцировкой в сторону остеобластов [Ling L. et al., 2010]. В подтверждение вышесказанному, в 3D модели с гепарином нами были получены положительные корреляции между уровнем экспрессии гена *BMP2* с *ALPL* ($r = 0,75$; $p < 0,05$) и *RUNX2* ($r = 0,71$; $p < 0,05$) (рис. 4). Интересной оказалась взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *BMP6* и долей клеток с фенотипом [CD45,34,14,20]⁺ ($r = 0,83$, $p < 0,05$), выявленная в 3D модели с гепарином, которая может косвенно указывать на процесс формирования «ниши остеобластов» с созданием гемопозитического микроокружения в этой экспериментальной группе (рис. 4). Интересно отметить, что максимальный уровень (относительно других групп исследования) экспрессии мРНК гена *CD49d* был зафиксирован в 2D модели с гепарином (1 МЕ/мл); тогда как в 3D моделях с гепарином и без него изучаемый показатель был выше контроля, но ниже (в среднем в 2,3 раза), чем в группе 2D модель с гепарином (табл. 2). Мы предполагаем, что высокая экспрессия мРНК гена *CD49d* в 2D модели с гепарином может носить компенсаторный характер, в связи со способностью молекулы гепарина связываться с интегрином VLA-4 [Schlesinger M. et al., 2009].

Далее, нами было оценено влияние TiКФ-образцов и гепарина (1 МЕ/мл) в условиях дистантного сокультивирования с ММСК-ЖТ на формирование культурой участков минерализации межклеточного матрикса на 21 сутки. Полученные нами данные демонстрировали статистически значимое увеличение площади минерализованной области на пластике около образцов во всех исследуемых 3D-моделях, культивируемых с гепарином и без него (в сравнении с 2D моделью с гепарином и без него) (табл. 3). Максимальная площадь минерализации была выявлена в 3D модели с гепарином (1 МЕ/мл) ($p < 0,05$), что может свидетельствовать об усилении комбинированного влияния TiКФ-образцов и гепарина (1 МЕ/мл) на процессы остеодифференцировки культуры ММСК-ЖТ. В исследовании Simann M. et al., (2015), при использовании 20 ЕД/мл нефракционированного гепарина на модели

стромальных клеток костного мозга, было выявлено повышение остеогенной и снижение их адипогенной дифференцировки [Simann M. et al., 2015]. Топография поверхности, в свою очередь, имеет основополагающее значение для адгезии и дифференцировки остеобластов, адсорбции белков и, таким образом, для остеointegrации материала [Matos G., 2021]. Резюмируя вышесказанное, выявленное нами повышение (в сравнении с 2D моделями с гепарином и без него) экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *RUNX2*, *BMP2*) и адгезии (*CD49d*), наряду с увеличением площади минерализации в 3D модели исследования с TiКФ-образцами в присутствии гепарина (1 МЕ/мл), может свидетельствовать об участии гепарина в инициации процесса остеодифференцировки ММСК-ЖТ при моделировании механизмов остеointegrации в условиях сокультивирования *in vitro*. Оценка содержания ростовых факторов, хемокинов и провоспалительных цитокинов в супернатантах клеточных культур на 14 сутки позволила установить, что при сокультивировании ММСК-ЖТ человека с TiКФ образцами в присутствии гепарина и без него, их секреторная способность претерпевала значительные изменения (табл. 4). Интересные результаты были получены при анализе содержания продуцируемых ММСК-ЖТ факторов в супернатантах клеточных культур 2D модели с гепарином. Согласно данным литературы, гепарин взаимодействует с большим количеством биологически активных молекул [Le Gall J. et al., 2021], потенциально продлевая период их полужизни за счет защиты от протеолитической деградациии или усиления их сигнальной способности, опосредованной взаимодействием с рецептором на клеточной поверхности [Chioldelli P. et al., 2015; Luo L. et al., 2019]. Концентрация ростовых факторов (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, за исключением VEGF), медиаторов с провоспалительной (TNF α , TRAIL, за исключением IL-6) и хемоаттрактантной (SDF-1 α , MCP-1, IL-8) активностью, определяемых нами в супернатантах культур ММСК-ЖТ в 2D модели с гепарином была ниже аналогичных значений 2D контроля, а также остальных экспериментальных групп. Исключение составили - VEGF и IL-6.

Таблица 3 - Суммарная площадь островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) в культурах ММСК-ЖТ человека в различных условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 21 день), Ме (Q1 - Q3)

Группы исследования		Суммарная площадь областей минерализации, мм ² /см ² поверхности лунки
2D модель n = 6 n1 = 55	1	0,0 (0,00 - 0,01)
2D модель_гепарин n = 6 n1 = 100	2	1,29 (0,92 – 1,35) p0<0,05
3D модель n = 6 n1 = 100	3	2,75 (2,80 – 3,21) p0,1<0,05
3D модель_гепарин n = 9 n1 = 150	4	3,72 (3,55 – 4,15) p0,1,2<0,05

Примечание: n – число наблюдений (образцов) в каждой группе исследования
n1 - число снимков

Причиной выявленных нами изменений, а именно низкого содержания биологически активных молекул в 2D модели с гепарином может быть способность гепарина дестабилизировать мРНК цитокинов посредством конкуренции с этими транскриптами мРНК за РНК-связывающие белки [Yang L., Yang Y., 1995]. Наши

результаты в отношении продукции VEGF и IL-6 находят подтверждение в источниках современной литературы. Так, группой ученых выявлено, что в культуре клеток костного мозга (12 суток), обработанной 100 и 1000 ЕД/мл гепарина натрия, регистрировались высокие уровни продукции VEGF и IL-6, что предполагает активную экспрессию этих факторов *in vitro* [Dregalla R. et al., 2022]. Т.о., гепарин в 2D модели (в чистом виде) оказывал ингибирующее влияние на цитокинпродуцирующую активность ММСК-ЖТ человека, за исключением продукции этими клетками VEGF и IL-6, что требует дополнительного исследования.

Иная ситуация наблюдалась при анализе цитокинпродуцирующей активности ММСК-ЖТ в 3D моделях с гепарином и без него. Спустя 14 дней сокультивирования, уровень ростового фактора HGF в 3D модели с гепарином был значительно выше, чем в остальных группах исследования, что может свидетельствовать о потере стволовости ММСК-ЖТ в связи с активацией процесса остеодифференцировки клеток, опосредованной действием гепарина и продуктов биодеградации КФ-покрытия (**табл. 4**). Недавно было показано, что рецептор этого фактора с-Met также существует на мембране остеокласта и его клетки-предшественницы, и HGF может заменять M-CSF, способствуя дифференцировке мононуклеарных клеток в остеокласты [Huang C. et al., 2020]. В связи с вышесказанным, интересными оказались взаимосвязи между содержанием HGF с числом CD73 ($r = -0,65$, $p < 0,05$), CD90 ($r = -0,72$, $p < 0,05$) и $[CD45,34,14,20]^+$ ($r = 0,75$, $p < 0,05$) клеток в 3D модели с гепарином (**рис. 4**). На 14 сутки содержание ростового фактора LIF в 3D модели с гепарином увеличивалось по сравнению с 2D моделью с гепарином и 3D моделью, однако не превышало таковой в 2D контроле без гепарина (**табл. 4**). В более ранних исследованиях было выявлено, что помимо роли данного фактора в процессах пролиферации, дифференцировки и выживаемости клеток, он может являться маркером проангиогенного потенциала ММСК, потенцируя процесс неоваскуляризации [Santos G. et al., 2020]. Полученные нами корреляции в 3D модели с гепарином между содержанием LIF и VEGF вполне подтверждают этот тезис ($r = 0,80$; $p < 0,05$) (**рис. 4**). Положительная корреляция в 3D модели с гепарином между содержанием LIF и M-CSF в супернатантах культур ($r = 0,89$; $p < 0,05$) (**рис. 4**) свидетельствует о присутствии в культуре ММСК пула гемопоэтических клеток. На 14 сутки уровень M-CSF в супернатантах 3D культур с гепарином значительно превышал цифры, полученные в 2D модели с гепарином, и был ниже значений в 3D модели (**табл. 4**). M-CSF является гемопоэтическим фактором роста, стимулирующим выживание, пролиферацию, дифференцировку клеток мононуклеарной линии [Hume D., MacDonald K., 2012]. Интересной была полученная положительная корреляция в 3D модели с гепарином между продукцией M-CSF и уровнем относительной экспрессии гена щелочной фосфатазы (*ALPL*) ($r = 0,61$; $p < 0,05$) (**рис. 4**), что также может означать инициацию процесса остеодифференцировки в данной экспериментальной группе. В 3D модели было зарегистрировано значимое повышение концентрации ростового фактора SCF в супернатантах культур на 14 сутки по сравнению с другими экспериментальными группами (**табл. 4**). Фактор SCF является важным регулятором регенеративных процессов, определяющим дифференцировку стволовых и прогениторных клеток [Зубкова Е. и др., 2017]. Стоит отметить наличие положительной корреляции между продукцией SCF и экспрессией гена *CD49d* в 3D модели с гепарином ($r = 0,63$; $p < 0,05$) (**рис. 4**), что в очередной раз указывает на взаимосвязь процессов пролиферации и адгезии в этой модели исследования, в конечном итоге, влияющих на судьбу клеточной культуры. Нами была задетектирована высокая продукция ростового фактора IL-3 в супернатантах культур на 14 сутки в 3D модели с гепарином, значимо отличающаяся от всех экспериментальных групп, что может косвенно свидетельствовать об увеличенном остеогенном и миграционном потенциале ММСК-ЖТ в этой группе исследования (**табл. 4**).

Таблица 4 - Концентрация (пг/мл) ростовых факторов (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, VEGF), медиаторов с провоспалительной (TNF- α , TRAIL, IL-6) и хемоаттрактантной (SDF-1 α , MCP-1, IL-8) активностью, определяемых в супернатантах культур ММСК-ЖТ человека в различных условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования - 14 дней), Ме (Q1 - Q3)

Исследуемые факторы, пг/мл	Группы исследования			
	2D модель n = 6	2D модель_гепарин n = 6	3D модель n = 6	3D модель_гепарин n = 9
	1	2	3	4
Ростовые факторы				
HGF	35,62 (32,63 - 38,6)	8,59 (6,37 - 10,81) p0<0,05	24,04 (16,39 - 30,69) p0,1<0,05	126,1 (115,37 - 236,9) p0,1,2<0,05
LIF	19,05 (18,79 - 19,31)	1,02(0,92 – 1,29) p0<0,05	11,32(8,23 – 14,15) p0,1<0,05	17,74(16,88 - 18,77) p0,1,2<0,05
M-CSF	5,04 (4,55 – 5,67)	1,23 (0,98 – 1,92) p0<0,05	8,32 (6,23 – 10,12) p0,1<0,05	4,84 (3,90 – 5,91) p1,2<0,05
SCF	5,94 (5,45 – 6,21)	1,09 (1,05 – 1,21) p0<0,05	10,12 (8,21 – 12,25) p0,1<0,05	5,96 (3,15 – 7,89) p1,2<0,05
IL-3	0,21 (0,19 - 0,22)	0,0 (0,00 – 0,00) p0<0,05	0,62 (0,59 - 0,66) p0,1<0,05	1,61 (1,58 - 1,63) p0,1,2<0,05
VEGF	120,04 (115,32 – 128,09)	165,66 (154,21 – 172,23) p0<0,05	302,02 (280,91 – 314,33) p0,1<0,05	475,10 (452,31 – 482,11) p0,1,2<0,05
Провоспалительные факторы				
TNF-α	2,06 (1,80 - 3,31)	0,94 (0,79 - 1,02) p0<0,05	3,3 (3,22 - 3,41) p0,1<0,05	2,33 (2,02 - 2,63) p1,2<0,05
IL-6	44,81 (38,15 – 47,23)	92,79 (87,13 – 98,22) p0<0,05	314,65 (291,11 – 350,23) p0,1<0,05	283,14 (276,13 – 293,23) p0,1<0,05
TRAIL	17,01 (15,04-19,02)	2,42 (1,81 – 3,21) p0<0,05	10,23(8,34 – 11,21) p0,1<0,05	24,32(20,23 – 26,10) p0,1,2<0,05
Хемокины				
SDF-1α	105,9 (103,8 - 118,1)	5,34 (3,28 – 6,40) p0<0,05	29,26 (28,78 - 29,74) p0,1<0,05	145,91 (142,12 - 149,81) p0,1,2<0,05
MCP-1	198,98 (182,13 – 201,11)	23,82 (19,12 – 26,21) p0<0,05	107,43 (101,01 – 114,23) p0,1<0,05	103,12 (95,14 – 108,29) p0,1<0,05
IL-8	103,15 (69,23 – 115,23)	15,65 (14,11 – 25,34) p0<0,05	59,12 (48,34 – 66,10) p0,1<0,05	86,32 (68,45 – 180,21) p1,2<0,05

Известно, что IL-3 способствует дифференцировке ММСК человека в функциональные остеобласты и увеличивает их регенеративный потенциал *in vivo* у мышцей с ослабленным иммунитетом [Barhanpurkar A. et al., 2012]. В 3D модели с гепарином нами была получена положительная корреляция между продукцией ростового фактора IL-3 и количеством жизнеспособных клеток ($r = 0,75$; $p < 0,05$) (**рис.**

4), что может говорить о поддержании жизнеспособности ММСК-ЖТ с помощью цитокина IL-3. Продукция ангиогенного фактора VEGF в супернатантах 14-дневных культур значимо возрастала в 3D модели с гепарином, относительно всех экспериментальных групп, что может быть связано с процессами ангиогенеза и остеогенным потенциалом воздействующих на ММСК-ЖТ факторов [K. Hu, B.R. Olsen, 2017] (табл. 4). На 14 сутки в 3D модели с гепарином концентрация TNF- α в супернатантах культур была выше в сравнении с 2D моделью с гепарином, но ниже, чем в 3D контроле (табл. 4). TNF- α - основной провоспалительный медиатор, способствующий привлечению воспалительных и стромальных клеток [Vallés G. et al., 2020]. Известно, что RANKL является важным фактором дифференцировки остеокластов, однако некоторые исследователи сообщают, что образование остеокластов может осуществляться без участия RANKL, но в присутствии TNF- α [Kitaura H. et al., 2022]. Учитывая вышесказанное, мы предполагаем, что ММСК-ЖТ в условиях 3D-модели с гепарином, продуцируют молекулы для возможного запуска дифференцировки остеокластов, что является важным этапом процесса регенерации кости. На 14 сутки нами была зарегистрирована повышенная концентрация IL-6 в супернатантах 3D модели с гепарином и без него (табл. 4). IL-6 может являться ключевым игроком в сохранении функции ММСК в качестве клетки-предшественницы и является вспомогательным фактором в пролиферации ММСК [Dregalla R. et al., 2022]. Интересно, что в 3D модели с гепарином нами были получены позитивные корреляции между IL-6 и хемокинами: IL-8 ($r = 0,95$; $p < 0,05$), MCP-1 ($r = 0,95$; $p < 0,05$) (рис. 4). В некоторых работах приводятся данные о взаимной регуляции экспрессии IL-6 и MCP-1 [Hosaka K. et al., 2017]. Секреция провоспалительного фактора TRAIL культурой ММСК-ЖТ в 3D модели с гепарином значимо повышалась по сравнению с остальными группами исследования (табл. 4). В 3D модели с гепарином нами была получена положительная корреляция между содержанием TRAIL и хемокинами: IL-8 ($r = 0,73$; $p < 0,05$), MCP-1 ($r = 0,73$; $p < 0,05$) (рис. 4). Регулируя воспалительный процесс, он способен стимулировать экспрессию IL-6, IL-8 и MCP-1, что было продемонстрировано в одной из работ [Zoller V. et al., 2017]. На 14 сутки исследования, нами были задетектированы высокие уровни SDF-1a в супернатантах 14-дневных культур в 3D модели с гепарином в сравнении со всеми экспериментальными группами, что может свидетельствовать об увеличении миграционного потенциала ММСК-ЖТ на 14 сутки культивирования (табл. 4). Известно, что SDF-1a может усиливать пролиферацию, миграцию ММСК, а также их антиапоптотическую способность, улучшая, тем самым, выживаемость клеточных трансплантатов. Количество моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) в 3D модели с гепарином было статистически ниже значений 2D контроля, но превышало таковой в 2D модели с гепарином, что может свидетельствовать об ингибировании гепарином продукции данного фактора (табл. 4).

Boomsma R. et al. (2012) продемонстрировали, что MCP-1 способен стимулировать клеточную миграцию ММСК, полученных из костного мозга, что может способствовать рекрутингу ММСК в очаги воспаления *in vivo* [Boomsma R., Geenen D., 2012]. Продукция хемокина IL-8 в модели с TiKФ-образцом и гепарином была значимо ниже значений контрольной группы, но повышена относительно моделей только с гепарином или имплантатом, что может говорить о совместном влиянии гепарина и трехмерного матрикса на секрецию IL-8 культурой ММСК-ЖТ (табл. 4). Используя биоинформатические методы, Wang L. et al. (2021) предсказали биологические процессы и молекулярные механизмы, с помощью которых IL-8 способствует активации эндотелиальных сосудистых клеток посредством его секреции ММСК, полученных из костного мозга человека [Wang L. et al., 2021]. Корреляционный анализ позволил выявить положительные взаимосвязи между содержанием CD73-позитивных клеток и уровнем воспалительных факторов и хемокинов в супернатантах экспериментальной 3D модели с гепарином: IL-8 ($r = 0,93$;

$p < 0,05$), IL-6 ($r = 0,88$; $p < 0,05$), TRAIL ($r = 0,73$; $p < 0,05$), MCP-1 ($r = 0,93$; $p < 0,05$) (рис. 4), что позволяет предположить эти клетки в качестве продуцентов вышеуказанных факторов. Таким образом, в 3D модели с гепарином регистрировались высокие уровни гемопоэтических (LIF, IL-3) факторов и VEGF (в сравнении с 2D и 3D контролем), тогда как уровень провоспалительных молекул (TNF- α , IL-6) был ниже чем в 3D контроле, что может свидетельствовать о модулирующем действии гепарина на продукцию ММСК-ЖТ молекул с разнонаправленным действием.

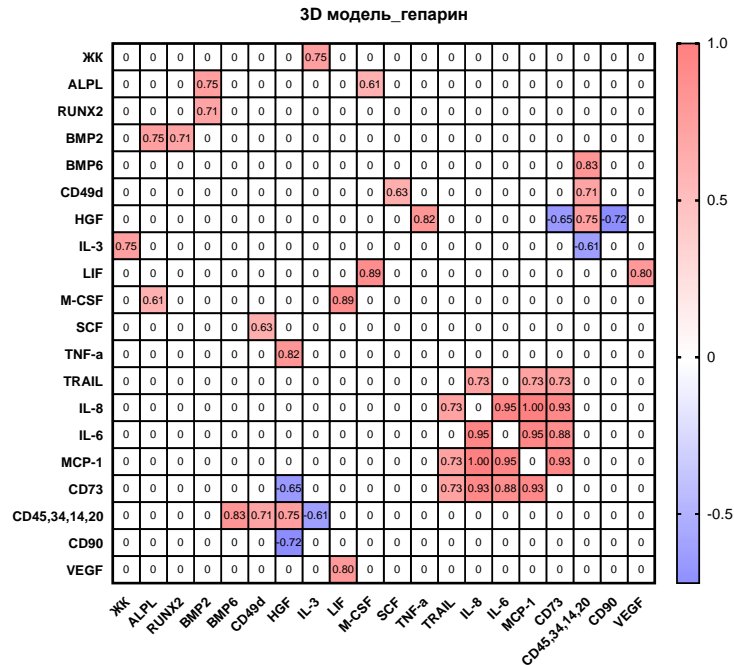


Рисунок 4 - Корреляционная матрица, отражающая взаимосвязь исследуемых параметров в 3D модели с гепарином. Цветом отмечены значимые различия при $p < 0.05$. Значение в ячейках (r) характеризуют силу взаимосвязи

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами экспериментальное *in vitro* 3D-моделирование функционирования ММСК-ЖТ человека в условиях регенерации костной ткани на фоне воздействия прямого антикоагулянта (гепарина), позволило получить новые знания фундаментального характера в области физиологии ремоделирования костной ткани (рис. 5). Так, нами выявлено, что совместное воздействие ТiКФ-образцов и гепарина (1 МЕ/мл) активировало *in vitro* дифференцировку культуры ММСК-ЖТ в остеобласты, что сопровождалось увеличением площади минерализации межклеточного матрикса на пластике на 21 сутки культивирования. Также об индукции остеогенного потенциала пула ММСК-ЖТ свидетельствовал рост экспрессии генов остеодифференцировки (*ALPL*, *BMP2*, *BMP6*) и снижение числа клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры стволовости (*CD73*, *CD90*, *CD105*). Снижение миграционного потенциала (через 92 ч) и увеличение экспрессии гена-субъединицы интегрин *CD49d* также может свидетельствовать об индукции процесса остеодифференцировки. На 14-е сутки в трёхмерной модели дистантного культивирования с гепарином регистрировалось увеличение продукции ростовых факторов (*HGF*, *M-CSF*, *SCF*, *LIF*, *IL-3*, *VEGF*), в том числе гемопоэтинов, хемокинов (*SDF-1a*, *MCP-1*, *IL-8*), а также провоспалительных цитокинов (*TNF- α* , *IL-6*, *TRAIL*), что может указывать на модулирующее влияние гепарина в совокупности с продуктами биодegradации (ионами кальция) на эффективное формирование *in vitro* прообраза системы "кость/костный мозг". Следует отметить, что жизнеспособность культур ММСК-ЖТ в условиях 2D- и 3D культивирования с гепарином не

изменялась, в то время как пролиферативная активность в группах с ТiКФ-образцами и гепарином достоверно понижалась в сравнении с 2D моделью с гепарином.

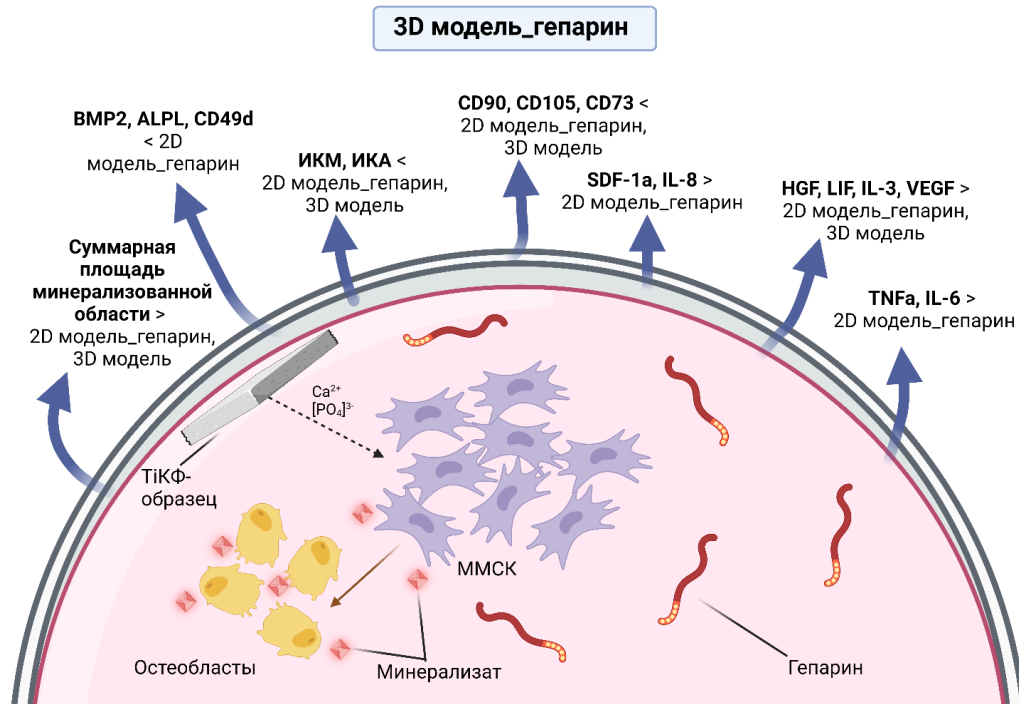


Рисунок 5 - Схема, отражающая регуляторные механизмы остеогенеза (в сравнительном аспекте), в условиях *дистантного in vitro* культивирования ММСК-ЖТ человека с трёхмерным скаффолдом с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральный матрикс костной ткани и прямым антикоагулянтом – гепарином (1 МЕ/мл)

Полученные нами результаты, в целом, неоднозначны и требуют дальнейшего изучения. Более детальное исследование закономерностей и механизмов функционирования ММСК-ЖТ при моделировании регенерации костной ткани на фоне воздействия прямых антикоагулянтов (гепарин), может послужить основой для расшифровки физиологических механизмов при ремоделировании костной ткани с использованием костно-замещающих имплантатов в тактике ведения пациентов с высоким риском развития послеоперационных тромбозов.

ВЫВОДЫ

1. В 14-21-суточной двумерной культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека с гепарином (1 МЕ/мл), формирование минерализованного межклеточного матрикса, характерного для культур остеобластов, ассоциировано с увеличением (в сравнении с 3D моделью с гепарином) уровня экспрессии генов остеодифференцировки (*ALPL*, *BMP2*, *BMP6*) и адгезии (*ген субъединицы интегрина VLA-4 - CD49d*), напротив, снижением числа клеток, несущих маркеры стволовости (*CD73*, *CD90*, *CD105*), а также доли гемопоэтических клеток $[CD45,34,14,20]^+$, на фоне низкого содержания в супернатантах клеточных культур ростовых факторов, в том числе, стимулирующих гемопоэз (*HGF*, *LIF*, *M-CSF*, *SCF*, *IL-3*), молекул с провоспалительной (*TNFa*, *TRAIL*) и хемоаттрактантной (*SDF-1a*, *MCP-1*, *IL-8*) активностью.

2. При 92-х ч экспериментальном культивировании выявлено ингибирующее, разной степени выраженности, действие гепарина (1 МЕ/мл) на миграционную активность ММСК-ЖТ человека, как в присутствии нановзвеси ГАП (1 мг/мл), так и без нее. Гепарин (1 МЕ/мл) в чистом виде оказывает индуцирующее влияние на

пролиферативную активность ММСК-ЖТ, тогда как при сокультивировании ММСК-ЖТ с гепарином (1 МЕ/мл) и взвесью наночастиц ГАП (1 мг/мл), пролиферативная активность клеточной культуры достоверно снижается.

3. В 14-21-суточной трёхмерной модели культивирования с гепарином (1 МЕ/мл), ММСК-ЖТ человека более эффективно (в сравнении с другими моделями) дифференцируются в остеобласты, формирующие межклеточный матрикс на пластике; выявленные изменения сопровождаются снижением числа CD73-, CD90-, CD105- позитивных клеток, ростом (в сравнении с 2D контролем, но ниже, чем в 2D контроле с гепарином) уровня экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *BMP2*, *BMP6*) и гена субъединицы интегрина VLA-4 (*CD49d*), повышением доли клеток с фенотипом гемопоэтических [CD45,34,14,20]⁺, на фоне сохранения высокой жизнеспособности клеточной культуры.

4. Достоверное увеличение (в сравнении с 2D моделью с гепарином) продукции ММСК-ЖТ человека ростовых молекул (HGF, M-CSF, SCF, LIF, IL-3 и VEGF), в том числе, гемопоэтических факторов, хемокинов (SDF-1a, MCP-1, IL-8), а также провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6, TRAIL), оказывает позитивное модулирующее влияние на эффективное формирование в 14-21-суточной трёхмерной модели дистантного *in vitro* культивирования с гепарином (1 МЕ/мл) прообраза системы "кость/костный мозг".

5. В трехмерной модели культивирования с гепарином (1 МЕ/мл), способность ММСК-ЖТ человека формировать *in vitro* минерализованный костный матрикс, как составная часть системы "кость/костный мозг», определяется не только межфазной границей раздела (матрикс / клетки), но и эффективной кооперацией между матриксом (за счет продуктов биодеградации), клетками и сигнальными молекулами (цитокины, факторы роста и др.), опосредованной модулирующим действием гепарина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Литвинова Л.С., Юрова К.А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Мелашченко Е.С., Мелашченко В.В., Шунькин Е.О., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., **Норкин И.К.**, Прокин К.И., Иванов П.А., Хлусов И.А. Роль трехмерных матриксов, имитирующих регенерирующую костную ткань в формировании пула гемопоэтических стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro* // **Российский Иммунологический Журнал**. – 2019. – Т. 13, № 4. – С.1555-1557 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,165).
2. Литвинова Л.С., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Хлусова М.Ю., Мелашченко В.В., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., **Норкин И.К.**, Иванов П.А., Хлусов И.А. Остеогенные и ангиогенные свойства гепарина как системы доставки биомолекул при биоинженерии кости: краткий критический обзор // **Биомедицинская химия**. – 2020. – Т. 66. – С. 431-436 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,827).
3. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Мелашченко 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 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,521).
4. Yurova K., Melashchenko E.S., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Shunkin E.O., **Norkin I.K.**, Ivanov P.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Osteogenic differentiation factors of multipotent mesenchymal stromal cells in the current understanding // **Current Pharmaceutical Design**. – 2021. – Vol. 27, № 35. - С. 3741-3751 (Q2 Scopus, SJR - 0,57).
5. **Norkin I.K.**, Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Melashchenko E.S., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Stimulating effect of high dose heparin on

- migration activity and MSC stemness preservation in the presence of bone-substituting materials // **Medical Immunology (Russia)**. – 2021. – Vol. 23, № 4. - С.831-838 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,718).
6. Юрова К.А., Мелашенко Е.С., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Мелашенко 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 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,718).
 7. Иванов П.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., **Норкин И.К.**, Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Роль мезенхимных стромальных/стволовых клеток в регуляции кроветворения в 3D-культуре *in vitro* // **Российский иммунологический журнал**. – 2021. – Т. 24, № 2. - С.153-160 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,165).
 8. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О., Мелашенко Е.С., **Норкин И.К.**, Иванов П.А., Кривошеев В.В., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Роль компонентов искусственных матриц, применяемых для регенеративной медицины, в борьбе с перипротезной инфекцией // **Гены & Клетки**. – 2021. – Т. XVI, №2. – С.21-33 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,404).
 9. **Norkin I.K.**, Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Melashchenko E.S., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Baikov A. N., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Study of the role of heparin in regulation of the morphofunctional properties of MSC *in vitro* // **Drug development & registration**. – 2022. – Vol. 11. – P. 174-179 (Q3 Scopus, SJR - 0,16; журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,446).
 10. **Норкин И.К.**, Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Лигатюк Д.Д., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Эффекты терапевтических доз гепарина на функциональную активность ММСК при моделировании механизмов остеоинтеграции в условиях культивирования *in vitro* // **Вестник уральской медицинской академической науки**. - 2022. - Т. 19, №3. - С. 231–240 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,363)
 11. **Норкин И.К.**, Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Изучение эффектов гепарина на остеоинтеграционный потенциал ММСК при моделировании остеоинтеграции в условиях сокультивирования *in vitro* // **Вопросы морфологии XXI века: сборник трудов: "Инновационные технологии в исследованиях, диагностике и преподавании"**. - 2022. - №7. - С. 169 – 175.
 12. **Норкин И.К.**, Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Дифференцировочный потенциал ММСК под влиянием терапевтических доз гепарина // **Гены и клетки**. - 2022. - Т. 17, №3. - С. 165-166 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,404).
 13. **Норкин И.К.**, Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Мелашенко В.В., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Цитокинпродуцирующая способность ММСК при моделировании механизмов остеоинтеграции в условиях культивирования *in vitro* в присутствии гепарина // **«Российская наука в современном мире»: сборник статей XLIX Международной научно-практической конференции**. - 2022. - С. 33-34.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2D (от англ. 2-dimensional) – двумерная культура	ИКП – индекс клеточной пролиферации
3D (от англ. 3-dimensional) – трехмерная культура	ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
ГАП – гидроксипатит	мРНК – матричная РНК
ГР – гепариновый раствор	НФГ – нефракционированный гепарин
ГСК – гемопоэтические стволовые клетки	ППС – полная питательная среда
ЖТ – жировая ткань	ПЦР – полимеразная цепная реакция
ИКМ – индекс клеточной миграции	CD (англ. cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

Норкин Игорь Константинович

**РЕАКЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В
УСЛОВИЯХ IN VI TRO МОДЕЛИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ
ТКАНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЕПАРИНА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

1.5.5. Физиология человека и животных

Подписано в печать __. __.2022
Формат 60x90 1/16. Усл. печ. листов 1,5
Тираж 100 экз. Заказ № ____

Отпечатано Полиграфическим центром
Балтийского федерального университета им. И. Канта
236001, г. Калининград, ул. Гайдара, 6