

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

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

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Л.С. Литвинова

Калининград – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 КОСТНАЯ ТКАНЬ.....	16
1.1.1. Остеогенез и физиологическая регенерация костной ткани.....	16
1.1.2. Механизмы регенерации костной ткани.....	17
1.2. МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ.....	19
1.2.1. Дифференцировка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	21
1.2.2. Иммуномодуляция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	21
1.2.3. Хоуминг и миграция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	22
1.2.4. Адгезия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	23
1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ ЗАМЕНИТЕЛЕЙ КОСТНОЙ ТКАНИ.....	24
1.3.1. Керамические материалы.....	24
1.3.2. Полимеры.....	25
1.3.3. Композитные биоматериалы.....	26
1.3.4. Титановые имплантаты.....	26
1.3.5. Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки в регенерации костной ткани.....	27
1.4. МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ.....	29
1.4.1. Основные стратегии восстановления костной ткани.....	30
1.4.2. Механизм тромбообразования.....	31
1.4.3. Гепарин – природный гликозаминогликан с антикоагулянтным действием.....	35
1.4.4. Эффекты гепарина на показатели гомеостаза клеток, опосредованные его связыванием с биомолекулами.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1. Объект и материал исследования.....	44
2.2.1. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.....	44
2.1.2. Титановые образцы с кальцийфосфатным покрытием.....	44
2.1.3. Прямой антикоагулянт.....	46

2.2. Методы исследования.....	47
2.2.1.Выделение культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из липоаспирата жировой ткани человека.....	48
2.2.2.Подсчет общего числа клеток в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, а также оценка жизнеспособности культуры.....	49
2.2.3.Анализ дифференцировочной и фенотипической принадлежности выделенного пула клеток к культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	49
2.2.4.Экспериментальное культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в присутствии/отсутствии гепарина и/или остеозамещающего материала.....	52
2.2.5.Оценка жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека методом проточной цитометрии.....	53
2.2.6.Анализ иммунофенотипа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека методом проточной цитометрии.....	54
2.2.7.Определение уровня относительной экспрессии мРНК генов методом полимеразной цепной реакции.....	56
2.2.8.Количественное определение концентрации факторов роста, медиаторов с провоспалительной, хемокиновой активностью методом проточной флуориметрии.....	59
2.2.9.Анализ дифференцировочного потенциала культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека методом цитологического дифференциального окрашивания и определение общей площади трехмерных островков/узелков минерализации.....	60
2.2.10.Оценка влияния гидроксиапатита в присутствии/отсутствии гепарина на миграционные и пролиферативные способности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP.....	62
2.2.11.Статистический анализ данных.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	65
3.1 Оценка жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в <i>in vitro</i> условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани в присутствии/отсутствии гепарина.....	65
3.2 Оценка фенотипических параметров мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в <i>in vitro</i> условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани в присутствии/отсутствии гепарина.....	66

3.3 Оценка относительной экспрессии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека мРНК генов остеодифференцировки и клеточной адгезии в <i>in vitro</i> условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани в присутствии/отсутствии гепарина	67
3.4 Оценка секреции факторов роста, хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека после сокультивирования с ТiКФ образцами в присутствии/отсутствии гепарина	71
3.5 Оценка <i>in vitro</i> минерализации культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в условиях сокультивирования с матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани в присутствии/отсутствии гепарина	75
3.6 Оценка миграционной и пролиферативной активностей мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека через микропоры с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP	78
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	111
ВЫВОДЫ	113
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	115

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- 2D (от англ. 2-dimensional) – двумерная культура
- 3D (от англ. 3-dimensional) – трехмерная культура
- ГАП – гидроксиапатит
- ГР – гепариновый раствор
- ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
- ЖТ – жировая ткань
- ИКМ – индекс клеточной миграции
- ИКП – индекс клеточной пролиферации
- КФ – кальцийфосфатный
- ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные/стволовые клетки
- мРНК – матричная РНК
- НМГ – низкомолекулярный гепарин
- НФГ – нефракционированный гепарин
- ППС – полная питательная сред
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ЩФ – щелочная фосфатаза
- ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс
- ALPL – (от англ. alkaline phosphatase) – щелочная фосфатаза
- BMP – (от англ. bone morphogenetic protein) – костный морфогенетический белок
- СаР – (от англ. calcium phosphate) – кальцийфосфатный
- CD – (англ. cluster of differentiation) – кластер дифференцировки
- HGF – (от англ. hepatocyte growth factor) – фактор роста гепатоцитов
- IL – (от англ. interleukin) – интерлейкин
- LIF – (от англ. leukemia inhibitory factor) – лейкемия-ингибирующий фактор
- MCP-1 – (от англ. monocyte chemoattractant protein 1) - моноцитарный хемотаксический фактор-1
- M-CSF – (от англ. macrophage colony-stimulating factor) - макрофагальный колониестимулирующий фактор
- RUNX2 – (от англ. runt-related transcription factor 2) - связанный с Runt транскрипционный фактор 2
- SCF – (от англ. stem cell factor) – фактор стволовых клеток

SDF-1a – (от англ. stromal cell-derived factor-1) - фактор стромальных клеток 1 альфа

TNF – (от англ. tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

TRAIL – (от англ. tumor necrosis factor ligand superfamily member 10) - цитокин семейства факторов некроза опухоли

VEGF – (от англ. vascular endothelial growth factor) - фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

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; Ratushnyy 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 эндодермальном (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 [Nempel 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 [Khilusov 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 остеоинтеграцию 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 продуцирующей 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-1a*, *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, гемопоэтических 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 гемопоэтических 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 трёхмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань, позволят расширить существующие **теоретические знания** о физиологических механизмах остеоинтеграции 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 остеоинтеграции 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» 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) и Государственного задания (№ FZWM-2020-0010).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 4 полнотекстовых статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, 10 статей и тезисов 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 КОСТНАЯ ТКАНЬ

1.1.1. Остеогенез и физиологическая регенерация костной ткани

Остеогенез представляет собой процесс формирования костной ткани, который начинается в период между шестой и седьмой неделями эмбрионального развития и продолжается примерно до двадцати пяти лет. Различают два типа окостенения кости: внутримембранное и эндохондральное. Каждый из этих процессов начинается с инициации пула клеток мезенхимального происхождения и заканчивается образованием костной ткани [Breeland G. et al., 2022].

Скелетная линия включает разнообразную группу клеток, которые поддерживают и восстанавливают кость во время гомеостатического костного ремоделирования, а также в условиях повреждения ткани. Эта линия клеток включает остеокласты, остеобласты, остециты и хондроциты [Bianco P. et al., 2015; Ambrosi T. et al., 2019]. Нормальный костный гомеостаз поддерживается посредством соблюдения баланса между активностью остеобластов и остеокластов; однако в условиях некоторых физиологических процессов, в том числе старения (особенно у женщин в постменопаузе), активность остеокластов превосходит активность остеобластов, что, в конечном итоге, приводит к увеличению костной резорбции и хрупкости костей [Garnero P. et al., 1996]. Остеобласты являются основными клетками, ответственными за формирование костной ткани. Они секретируют белки внеклеточного матрикса, такие как коллаген I типа, остеопонтин, остеокальцин и щелочную фосфатазу. Отложение кальция в форме гидроксиапатита с коллагеном I типа обеспечивает формирование костного матрикса и прочность кости [Long F. et al., 2011].

Заживление переломов, как и эмбриональное развитие, напрямую регулируется факторами, связанными с BMPs, TGF- β , FGF, паратироидным гормоном (PTH), Wnt-белками, факторами роста тромбоцитов (PDGFs) и семейства инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) [Phillips A. et al., 2005]. Во время реализации процесса заживления переломов продукция клетками TGF- β и BMP увеличивается, чтобы стимулировать миграцию прогениторных клеток-

предшественников в очаг повреждения. После этого, при содействии с факторами - FGF, PDGF и IGF, индуцируется пролиферация клеток с их последующей дифференцировкой, которая в значительной степени регулируется белками семейства BMP [Barnes G. et al., 1999; Al-Aql Z. et al., 2008]. Семейство белков BMP участвует в морфогенетических процессах, образуя петли обратной связи в сигнальных путях во время заживления переломов. Такой баланс взаимодействий может быть нарушен из-за серьезных повреждений, сопутствующих заболеваний или больших размеров дефектов/переломов. Нарушение передачи сигналов и/или отсутствие клеток-предшественниц – приводит к недостаточному регенеративному потенциалу и необходимости усилить восстановление кости с помощью других факторов [Ho-Shui-Ling A. et al., 2018].

1.1.2. Механизмы регенерации костной ткани

Регенерация кости - это сложный, организованный процесс заживления костной ткани, в реализации которого участвуют клетки-предшественницы, а также эндотелиальные, гемопоэтические и иммунокомпетентные клетки. Процесс регенерации строго регулируется и включает начальную фазу воспаления, фазу образования гематомы, во время которой происходит привлечение клеток-предшественниц в очаг повреждения, фазу образования промежуточной мозоли, созревания мозоли и фазу окончательного ремоделирования костной мозоли до исходной структуры и формы кости [Holmes D., 2017]. Согласованное действие клеток контролируется совокупностью биохимических, физических и механических факторов [Seeman, 2008], в значительной степени воспроизводящих развитие эндохондральной кости во время эмбриогенеза [Gerstenfeld L. et al., 2003].

Первичный перелом вызывает локальное разрушение сосудистой сети и нарушение целостности окружающих тканей, что приводит к образованию гематомы, с последующей инициацией острой воспалительной фазы [Claes L. et al., 2012]. Гематома состоит из клеток периферической крови и интрамедуллярного гемопоэтического компартмента [Kolar P. et al., 2010]. Этот процесс происходит из-за коагуляции плазмы и воздействия тромбоцитов на внесосудистую среду, которые вместе образуют фибриновую сеть в качестве первой временной матрицы.

Таким образом, в гематоме в месте перелома содержится высокая концентрация ангиогенных факторов роста, что способствует сильной проангиогенной активности. Научно подтверждена необходимость формирования гематомы в месте повреждения: ее удаление ослабляет восстановление тканей, тогда как трансплантация стимулирует образование новой кости [Street J. et al., 2000]. Мягкий матрикс гематомы позволяет привлекать и инфильтрировать клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы) в течение суток после перелома. Посредством продукции провоспалительных и хемотаксических факторов, таких как интерлейкин 6 (IL-6) и хемокиновый лиганд 2 (CCL2), нейтрофилы способствуют миграции в очаг повреждения моноцитов и макрофагов [Gerstenfeld L. et al., 2003; Claes L. et al., 2012; Prystaz K. et al., 2018].

Воспалительные клетки, мигрирующие к месту повреждения, фагоцитируют временный фибриновый матрикс, а остеокласты уничтожают некротические фрагменты кости. Кроме того, макрофаги, приобретающие противовоспалительный фенотип M2 под воздействием IL-4 [Schlundt C. et al., 2018], секретируют набор медиаторов воспаления и хемотаксиса, включая SDF-1 α , фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), IL1 β , IL-6, CCL2, BMPs, факторы роста фибробластов (FGF) и белки, задействованные в сигнальном пути WNT2, необходимые для инициации хоуминга клеток-предшественниц из костного мозга, надкостницы и кортикальной кости [Gerstenfeld L. et al., 2003]. Фаза острого воспаления с гематомой продолжается около недели, после чего гематома замещается грануляционной тканью, которая состоит из встроенных в неорганизованный внеклеточный матрикс пролиферирующих клеток-предшественников и вновь образующейся сосудистой сети. Сбалансированный острый воспалительный ответ имеет решающее значение для физиологического процесса заживления перелома, тогда как истощение пула макрофагов или снижение концентрации воспалительных цитокинов нарушает каскад заживления [Raggatt L. et al., 2014; Schlundt C. et al., 2018]. Кроме того, переключение с провоспалительного фенотипа макрофагов M1 на противовоспалительный M2 фенотип, вероятно, опосредуется как аутокринной, так и паракринной передачей сигналов макрофагов и клеток-предшественниц, мигрировавших в очаг повреждения [Schlundt C. et al., 2018].

После эффективного завершения воспалительной стадии, реализуются следующие этапы процесса заживления перелома, которые в значительной степени повторяют процесс развития длинных костей в эмбриональном периоде: 1) миграция скелетных прогениторных клеток к месту остеогенеза, 2) адгезия и уплотнение клеток, 3) дифференцировка клеток в сторону хондроцитов и/или остеобластов [Dunlop L., Hall B., 1995; Hall B., Miyake T., 2000]. Было обнаружено, что прогениторные скелетные клетки рекрутируются локально и одновременно из надкостницы, костного мозга/эндоста и/или твердой мозговой оболочки во время восстановления кости. Все перечисленные клеточные источники дают начало остеобластам, тогда как надкостница является основным источником хондроцитов [Colnot C., 2009; Duchamp de Lageneste O. et al., 2018]. Важно отметить, что межклеточные сигналы и сигналы внешней среды модулируют клеточную судьбу в этих тканях [Gerstenfeld L. et al., 2003; Schindeler A. et al., 2008]. Локальная гипоксия в месте перелома индуцирует продукцию ангиогенных факторов, в частности, VEGF, необходимых для стимуляции неоангиогенеза [Al-Aqil Z. et al., 2008]. Остеобласты зависимы от окислительного метаболизма и нуждаются в постоянном и значительном поступлении кислорода и питательных веществ. Следовательно, остеобласты располагаются вблизи новообразованных кровеносных сосудов возле очага повреждения [Riddle R., Clemens T., 2017].

1.2. МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

ММСК - мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, которые можно определить, как негематопоэтические мультипотентные стволовые клетки, обладающие способностью дифференцироваться в мезодермальную линию (адипоциты, остеоциты и хондроциты), эктодермальную линию (нейроциты) и эндодермальную линию (гепатоциты) [Wang Y. et al., 2012; Ullah I. et al., 2015]. В 1966 году Фриденштейн и его коллеги впервые обнаружили, что ММСК способны дифференцироваться в разных направлениях [Friedenstein A. et al., 1966]. С тех пор ММСК стали хорошо известным источником клеток как для доклинических, так и для клинических применений. Они обладают отличной способностью к самообновлению *in vitro* [Qiao C. et al., 2008]. Существуют различные источники

получения ММСК, такие как жировая ткань, костный мозг, периферическая кровь, а также перинатальные ткани, в т.ч. пуповинная кровь, плацента, околоплодные воды и амниотическая оболочка [Zhao S. et al., 2010; Hua J. et al., 2013]. Источник получения ММСК сильно влияет на разнообразие экспрессии поверхностных мембранных маркеров и профиль продуцируемых цитокинов [Németh K. et al., 2009; Wu Y. et al., 2017]. Однако основными идентификационными маркерами ММСК, презентующимися на их поверхности, являются CD73 (кластер дифференцировки 73), CD105, CD90, при этом клетки должны не должны экспрессировать на мембране CD34, CD14, CD4, CD11b, CD19 и HLAII (антигены лимфоцитов человека II класса) [Dominici M. et al., 2006].

Быстрое развитие молекулярной биологии и методов трансплантации способствовало применению ММСК в регенеративной медицине. Их иммунологические свойства, в том числе провоспалительные и иммуносупрессивные, способствуют их потенциальной роли иммунорегуляторных агентов [Aggarwal S., Pittenger M., 2005; Gao F. et al., 2016].

ММСК способны секретировать широкий спектр биологически активных медиаторов, в совокупности называемых “секретомом”, который поддерживает регенеративные процессы в поврежденных тканях. Он включает компоненты внеклеточного матрикса, белки, участвующие в процессе адгезии, ферменты, их активаторы и ингибиторы, факторы роста и связывающие белки, цитокины, хемокины и многие другие молекулы [Kucsova-Skalnikova E., 2013]. Эти факторы оказывают регулирующее влияние на биологические процессы. Также ММСК секретируют факторы, инициирующие ангиогенез, такие как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), однако стоит отметить, что они могут и ингибировать этот процесс за счет экспрессии монокина, индуцированного интерфероном γ (MIG) и тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMP) 1 и 2 [Cantiniaux D. et al., 2013; Zanotti L. et al., 2016]. Важную роль в процессе регуляции (блокирования или стимуляции) клеточного хемотаксиса играют секретируемые ММСК хемокины, такие как: CCL5, CXCL12 или CCL8. Медиаторами, контролирующими процесс клеточной регенерации, являются факторы роста с антиапоптотическим действием, такие как: HGF, IGF-1, VEGF и многие другие [Andrzejewska A. et al., 2019].

1.2.1. Дифференцировка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Потенциал разнонаправленной дифференцировки - одна из наиболее важных характерологических особенностей ММСК. Транскриптомная, протеомная, иммунофенотипическая и иммуномодулирующая активности различных типов ММСК отличаются, что говорит об уникальных потенциалах дифференцировки клеток, полученных из разных тканевых источников. ММСК, происходящие из разных тканей, имеют различный потенциал к дифференцировке в разные клональные клетки конечной стадии, такие как остеобласты и хондроциты. ММСК костного мозга демонстрируют превосходную способность к остеогенезу и хондрогенезу в соответствии со стандартными протоколами дифференцировки [Lin H. et al., 2019], а ММСК, полученные из синовиальной оболочки, демонстрируют более значительный пролиферативный и хондрогенный потенциал, чем ММСК из жировой ткани [Mochizuki T. et al., 2006]. ММСК, полученные из пуповинной крови, обладают биологическими преимуществами по сравнению с другими источниками, включая их способность к более длительному культивированию, значительному замедлению клеточного старения и более сильному противовоспалительному эффекту [Jin H. et al., 2013].

Хотя ММСК обладают способностью к дифференцировке, основным механизмом их терапевтического действия в доклинических и клинических исследованиях считается их мощный иммуномодулирующий эффект. За счет паракринных эффектов ММСК стимулируют ангиогенез, предотвращают апоптоз, подавляют воспаление и контролируют ремоделирование внеклеточного матрикса [Jiang W., Xu J., 2019].

1.2.2. Иммуномодуляция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

ММСК могут инициировать воспалительный ответ при неэффективном иммунном ответе и подавлять воспалительный ответ в случае гиперактивации иммунной системы. ММСК могут воспринимать различные сигналы опасности через TLR (Toll-подобные рецепторы) [Romieu-Mourez R. et al., 2009].

Активированные ММСК способны реагировать на лиганды TLR и высвобождать противовоспалительные факторы. Иммунодепрессивная активность ММСК стимулируется провоспалительными факторами, такими как IFN- γ , TNF- α и IL-1 β [Uccelli A. et al., 2008; Bernardo M., Fibbe W., 2013].

После завершения стадии воспаления *in vivo* ММСК функционально способствуют заживлению ран, участвуя в процессе клеточной пролиферации. В дополнение к резидентным периваскулярным ММСК, другие ММСК, происходящие из тканей/органов, рекрутируются в участки ран за счет хемотаксиса к хемокинам и молекулам адгезии, продуцируемым во время стадии воспаления [Karp J., Leng G., 2009]. Большинство типов клеток, находящихся непосредственно рядом с раной, включая эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты и резидентные фибробласты, реагируют на секретом ММСК, что способствует их выживанию, активации и пролиферации, запускает процессы реэпителизации, ангиогенез и фиброплазии [Maxson S. et al., 2012; Zambetti N. et al., 2016].

1.2.3. Хоуминг и миграция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

На процесс миграции и хоуминга ММСК влияют как химические (например, хемокины, цитокины и факторы роста), так и механические факторы (например, гемодинамические силы) [Fu X. et al., 2019]. Исследования *in vivo* доказали, что сигнальный путь SDF-1/CXCR4 действует как главный фактор в модификации подвижности ММСК, трансплантированных внутривенным путем, а также показали, что улучшение экспрессии CXCR4 может быть возможным подходом к развитию приживления трансплантата. Кроме того, усиление экспрессии SDF-1 в миокарде после индукции инфаркта миокарда может способствовать приживлению трансплантированных ММСК в поврежденном сердце и, таким образом, восстанавливать работу сердца, поддерживая неоваскуляризацию в моделях *in vivo* [Zhuang Y. et al., 2009]. В целом было выявлено большое разнообразие механических и химических факторов, влияющих на миграцию ММСК; тем не менее, большинство результатов получены с помощью однофакторного анализа на

клеточном уровне *in vitro*, что подчеркивает достижения исследований *in vivo* [Markov A. et al., 2021].

1.2.4. Адгезия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Имеются данные о том, что ММСК проходят через капилляры в посткапиллярные венулы аналогично хоумингу лейкоцитов [Andrian von U., 1997]. Взаимодействия клетка-клетка и клетка-матрикс, имеющие решающее значение для миграции, роста и выживаемости клеток, в значительной степени опосредуются интегринами [Majumdar M. et al., 2003]. Взаимодействие интегрин LFA-1/ICAM-1 считается одной из основных пар молекул адгезии, вносящих вклад в процесс миграции лейкоцитов через эндотелий, что может быть экстраполировано на культуру ММСК [Wee H. et al., 2009]. Исследования показали, что адгезия лейкоцитов при воспалении протекает по каскадному типу, в котором интегринины ответственны за прочную адгезию и трансмиграцию лейкоцитов [Ley K. et al., 2007].

Исследования по блокированию и нокауту интегринина подтвердили, что миграция ММСК связана с их взаимодействием с интегрининами и селектинами. ММСК экспрессируют молекулы адгезии, такие как интегринины, селектины и хемокиновые рецепторы, участвующие в связывании, адгезии и трансмиграции лейкоцитов из кровотока в ткани. ММСК способны экспрессировать следующие молекулы интегринина: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$ и $\beta 4$. ММСК также экспрессируют другие молекулы адгезии, в том числе: VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3, CD166 (ALCAM), эндоглин/CD105 [Ghaffari-Nazari H., 2018].

Со стороны экстравазатных клеток, в том числе ММСК, экспрессия лигандов важна для трансэндотелиальной миграции и включает активацию CD44 (HSCAM) и CD49d (цепь интегринина альфа-4) [Chamberlain G. et al., 2011]. Рецепторы адгезии позволяют циркулирующей клетке сканировать эндотелий. После сканирования и обнаружения эндотелиального паттерна [Perretti M., 1998], активация рецептора приводит к прочной клеточной адгезии. Мигрирующая клетка прокладывает себе путь через окружающие ткани, используя протеазы, вырабатываемые после стимуляции цитокинами или хемокинами. Взятые вместе экспрессия, повышенная

регуляция и активация молекул адгезии должны выполняться для экстравазации циркулирующих клеток [Nitzsche F. et al., 2017].

1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ ЗАМЕНИТЕЛЕЙ КОСТНОЙ ТКАНИ

Известно, что кость состоит из: 50–74 % минеральной фазы (в основном гидроксиапатит 45–58%, карбонат ~4%, цитрат ~0,9%, натрий ~0,7%, магний ~0,5% и другие микроэлементы, включая F-, K+, Sr²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺), 16-40 % органических веществ (85-90% коллагена) и 10 % воды [Eliasz N., Metoki N., 2017; Murugan R., Ramakrishna S., 2005]. Таким образом, разработки многих исследователей направлены на создание новых биосовместимых материалов/каркасов, максимально схожих с костной тканью по характеристикам (в т.ч. по составу и структуре) [Vrânceanu M. et al., 2012]. Кроме того, эти биоматериалы должны обладать биосовместимостью (то есть способностью материала встраиваться в живой организм без патологической активации иммунного ответа и срыва иммунотолерантности), биоразлагаемостью (способностью биоматериала разлагаться в результате естественных процессов костеобразования *de novo*), специфические структурные особенности, например, пористость и соответствующие остеоиндуктивные/остеокондуктивные свойства, необходимые для стимуляции клеточной пролиферации и дифференцировки в остеогенном направлении в очаге регенерации костной ткани [Liu G. et al., 2010; Perez J. et al., 2018].

1.3.1. Керамические материалы

Преимущество керамических материалов для регенеративной медицины состоит в том, что они биосовместимы с внутренней средой организма человека и устойчивы к сжатию и коррозии. Тем не менее, у этих биоматериалов есть недостатки, такие как хрупкость и низкая прочность [Kaur G. et al., 2014]. Керамические изделия широко используются в регенеративной медицине благодаря своим физико-химическим свойствам. Наиболее часто используемые керамические биоматериалы состоят из фосфата кальция (CaP) и/или

трикальцийфосфата (TCP) [Perez J. et al, 2018]. В исследовании Ishikawa K. et al. (2018) был проведен сравнительный анализ трех коммерческих производных керамических заменителей костной ткани с различным составом: гидроксиапатит (HAp, Neobone®), карбонат-апатит (CO3Ap, Cytrans®) и β -трикальцийфосфат (β -TCP, Cerasorb®) [Ishikawa K. et al., 2018]. Результаты проведенного исследования позволили доказать, что CO3Ap отличается ограниченным растворением и большей стабильностью в физиологических условиях (pH = 7,3) по сравнению с другими исследуемыми материалами.

1.3.2. Полимеры

Полимерные биоматериалы могут быть как натурального, так и синтетического происхождения. Натуральные полимеры имитируют структуру и биохимические свойства органического матрикса натуральной кости; однако у природных полимеров есть некоторые недостатки, такие как, например, низкая термостойкость. К природным полимерам относятся коллаген или хитозан. Коллаген наиболее важный белок кости, который занимает большую долю органического матрикса [Thrivikraman G. et al., 2017]. К сожалению, чистый коллаген не обладает удовлетворительными механическими свойствами, в связи с этим его обычно конъюгируют, например, с керамическими биоматериалами. Хитозан - это линейный полисахарид, на поверхности которого присутствуют аминогруппы, усиливающие взаимодействие с гликозаминогликанами и протеогликанами, тем самым стимулируя продукцию цитокинов и ростовых факторов стволовыми клетками, необходимых для регенерации костной ткани [Costa-Pinto A. et al., 2011; Costa-Pinto A. et al., 2012].

Еще одним натуральным заменителем костной ткани, используемым в тканевой инженерии, является деминерализованный костный матрикс, который получают из костей (свежие голени крупного рогатого скота), лишенных минеральных компонентов, но богатых коллагеном I типа и другими факторами роста [Holt D., Grainger D., 2012; Sawkins S. et al., 2013]. Недавно Desai et al. (2015) продемонстрировали, что использование донорских деминерализованных костных

матриц в сочетании с аутологичным концентратом костного мозга может повысить эффективность лечения костного дефекта [Desai P. et al., 2015].

1.3.3. Композитные биоматериалы

Композитные биоматериалы получают при использовании комбинации полимерных материалов и керамических каркасов. Этот тип биоматериала отличается высокой биосовместимостью, механической прочностью и способностью выдерживать большие нагрузки, благодаря которым эти биоматериалы являются вариантом выбора для тканевой инженерии [Niemeyer P. et al., 2004].

В недавних исследованиях *in vitro* и *in vivo* исследователи проводили анализ композитного биоматериала, образованного пористым гидроксиапатитом и коллагеном, с целью выявления его биологических и механических свойств. В частности, Mazzoni E. et al. (2017) [Mazzoni E. et al., 2017] оценили особенности биосовместимости каркасов, состоящих из ГА и микрофибриллярного коллагена в условиях культивирования *in vitro*, а также их остеокондуктивность и остеоиндуктивность, с использованием культуры ММСК, полученной из жировой ткани человека. Результаты показывают, что этот биоматериал может инициировать остеогенную дифференцировку ММСК, поскольку индуцирует активацию генов остеоидифференцировки на фоне увеличения жизнеспособности клеток и минерализации матрикса без токсических эффектов.

1.3.4. Титановые имплантаты

Имплантаты, изготовленные из технически чистого титана и титановых сплавов, получили наибольшее распространение и успешно используются благодаря благоприятному сочетанию биосовместимых свойств, стойкости к коррозии [Wang K., 1996] и уникальными характеристиками для эффективной остеоинтеграции [Steinemann S., 1998]. Первоначально остеоинтеграция была определена Brånemark et al. (1977) как «прямая структурная и функциональная связь между упорядоченной живой костью и поверхностью, несущую нагрузку имплантата» [Brånemark P. et al., 1977]. Другими словами, под остеоинтеграцией

подразумевают включение нежизнеспособного компонента в живую кость, что приводит к эффективному, надежному и предсказуемому механизму фиксации [Brånemark R. et al., 2001]. Для успешной остеоинтеграции имплантат должен иметь прочное и неподвижное соединение между поверхностью биоматериала имплантата и окружающей костной тканью, известное как «первичная стабильность» [Lioubavina-Hack N. et al., 2006]. Благоприятный результат лечения костных дефектов с использованием титановых имплантатов *in vivo* также основан на биологическом ответе остеогенных клеток, то есть остеобластов, на имплантат в период заживления [Puleo D., Nanci A., 1999]. Однако, несмотря на все эти преимущества, титановые имплантаты могут быть не совместимы с биологической средой организма [Kurella A., Dahotre N., 2005]. Следовательно, чтобы повысить биоактивность и улучшить остеоинтеграцию имплантата, широко изучаются многочисленные методы, связанные с модификацией поверхности или использованием различных видов покрытий титановых имплантатов. Модификации поверхности, такие как плазменное напыление титана [Babbush C. et al., 1986], дробеструйная очистка [Wennerberg A. et al., 1996], анодирование [Yao C., Webster T., 2006], кислотное травление [Klokkevold P. et al., 1997] или покрытия фосфатом кальция [Narayanan R. et al., 2008], широко исследуются в настоящее время. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования реакции ткани при взаимодействии с имплантатом на новые покрытия или модификации поверхности имплантатов, поскольку оптимальная динамика остеоинтеграции имплантата изучена не до конца.

1.3.5. Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки в регенерации костной ткани

Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) были описаны Friedenstein A. et al. впервые в 1970 году как тип фибробластных клеток, которые могут производить линии клонов со способностью генерировать костную и ретикулярную ткань на моделях морских свинок [Friedenstein A. et al., 1970]. Трансплантация аутологичных клеток - эффективный способ лечения крупных костных дефектов, благодаря которому нивелируются такие проблемы, как

ограниченная доступность аутологичной кости и иммуногенность аллогенной кости. Существуют основные формы клинического применения клеточной терапии при регенерации костей: клеточная терапия без размножения в культуре и клеточная терапия с экспансией *ex vivo* (в некоторых странах) [Verboket R. et al., 2018]. В первом случае клетки собирают во время операции. Например, в 2010 году Jäger et al. успешно вылечили более 100 пациентов с локальными нарушениями заживления костной ткани, используя композит биоматериала в сочетании с концентратом аспирации костного мозга [Mazzoni E. et al., 2017]. Это исследование показало, что использование концентрата аспирации костного мозга снижает объем сбора аутогенной кости на 50% без отрицательного воздействия на заживление кости. С другой стороны, вторая форма клинического применения включает трансплантацию аутологичных клеток после культивирования *ex vivo*. В исследовании немецких ученых Nöth U. et al. (2007) сообщили, что смешанная популяция из стволовых клеток костного мозга культивировалась в течение 12 дней в условиях GMP, а затем была проведена аутологичная трансплантация совместно с трикальцийфосфатным биоматериалом [Nöth U. et al., 2007]. Sponer P. et al. (2016), в исследовании объединили аутологичные ММСК и ультрапористый β -трикальцийфосфат (β -ТСР) для восстановления дефектов костей человека. Полученные данные продемонстрировали, что добавление ММСК привело к большему ремоделированию трабекул при дефектах бедренной кости [Šponer P. et al., 2016].

Исследование Obermeyer T. et al. (2012) сообщает, что ММСК, выделенные из костного мозга трансгенных мышей C57BL/6 и введенные внутривенно после перелома, могут мигрировать к месту дефекта и способствовать заживлению перелома [Obermeyer T. et al., 2012].

Исследователи и ученые сталкиваются с множеством препятствий на пути внедрения инновационных стратегий заживления костей в клиническое и коммерческое применение. Клеточные методы лечения особенно трудно реализовать из-за сложных юридических аспектов и дополнительных шагов, необходимых для подготовки клеток перед имплантацией и оценки их судьбы после имплантации [Bara J. et al., 2016].

1.4. МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Восстановление костной ткани является сложным регенеративным процессом, который повторяет биологические процессы эмбрионального развития скелета. В нормальных условиях процесс регенерации костной ткани приводит к успешному заживлению и восстановлению поврежденной кости. Однако, около 5-10% переломов характеризуются замедленными консолидациями или полным не сращением костей. Часто такие осложнения развиваются при наличии сопутствующих хронических заболеваний, как, например, диабет [Ho-Shui-Ling A. et al., 2018].

Переломы костей - одно из наиболее распространенных повреждений тканей, которое возникает, как правило, в результате высокоэнергетических травм. Кость обладает уникальной способностью к заживлению без образования рубца [Ho-Shui-Ling A. et al., 2018]. Однако в случае сложных переломов костей (большие очаги повреждений, патологические очаговые нарушения тканей рядом с местом повреждения) заживление может не произойти, что приведет к несращению перелома. Более того, неправильное изначальное лечение перелома может привести к осложнениям, ведущим к несращению [Holmes D., 2017]. Наиболее опасны патологические состояния, которые характеризуются плохой и/или нарушенной васкуляризацией и недостаточным количеством клеток-предшественниц, которые участвуют в образовании новой кости, что приводит к нарушению естественного процесса регенерации [Holmes D, 2017].

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, в структуре общей заболеваемости населения Российской Федерации, травмы занимают третье место. Травматизм у мужчин в 2 раза выше, чем у женщин, причем у мужчин трудоспособного возраста в структуре общей заболеваемости травмы занимают первое место. Около 12% больных, получивших травму, нуждаются в госпитализации в специализированные лечебные учреждения. Травмы и заболевания опорно-двигательного аппарата занимают второе место среди причин временной нетрудоспособности населения и третье место – среди причин инвалидности. По данным мировой литературы, травмы занимают третье место в структуре общей летальности населения. В последние годы четко прослеживается увеличение смертности от травм, вплотную приближаясь к летальности от

сердечно-сосудистых заболеваний. Среди многочисленных видов механических травм, одно из основных мест занимают повреждения костей нижних конечностей. В совокупности эти заболевания дали наибольшее число дней нетрудоспособности населения (33 % от общего числа 16 основных заболеваний), опередив патологию органов дыхания [Андреева Т., 2010].

1.4.1. Основные стратегии восстановления костной ткани

Для лечения переломов все чаще используют ортобиологические препараты - биологические вещества, активные молекулы, стволовые клетки или деминерализованные костные трансплантаты, которые способствуют более быстрому заживлению костных дефектов [Ho-Shui-Ling A. et al., 2018]. В настоящее время «золотым стандартом» лечения пациентов, страдающих медленным или неполным заживлением кости, является трансплантация кости с использованием ауто трансплантата или аллотрансплантата. Однако у этой терапевтической стратегии есть существенные недостатки, которые лимитируют ее применение. Например, обработка ауто трансплантатом ограничивается объемом кости, который может быть взят из гребня подвздошной кости и впоследствии трансплантирован на место дефекта. Этот метод является инвазивным, поэтому сопровождается хирургическими рисками, в том числе кровотечением, инфекционным воспалением, а также повреждением донорского участка и боли в месте взятия материала и т.д. [Amini A. et al., 2012; Habibovic P., 2017]. Аллотрансплантаты также имеют некоторые ограничения, связанные с их применением, такие как отсутствие потенциальных доноров, высокая стоимость, необходимость стерилизации и риск передачи инфекционных агентов, иммуноопосредованное отторжение трансплантата или реакция “трансплантат против хозяина” [Ho-Shui-Ling A. et al., 2018; De Witte T. et al., 2018]. Стратегия лечения в крайнем случае - дистракционный остеогенез, который в значительной степени успешен, но подразумевает длительный, болезненный метод терапии [Vanderstappen J. et al., 2015; Einhorn T., Gerstenfeld L., 2015].

Следовательно, для пациентов, страдающих медленным или неполным заживлением кости, необходима более стабильная и долгосрочная стратегия

лечения. С этой целью разрабатываются заменители костного трансплантата, чтобы содействовать эффективному заживлению переломов. В зависимости от степени тяжести травмы можно выделить три основных стратегии восстановления кости: 1) использование только синтетических каркасов, 2) использование каркасов в сочетании с активными молекулами и 3) использование комбинированных продуктов на основе клеток из различных тканевых источников. Традиционно, каркасы используются при травмах позвоночника, в то время как комбинация биоматериалов/каркасов со стволовыми клетками и/или факторами роста обычно применяют в тканевой инженерии для восстановления целостности костей [Jaquinta M. et al, 2019].

Биосовместимость материалов, контактирующих с кровью, опосредована в основном, тромботической реакцией, вследствие повреждения микрососудистой сети, вызванной инвазивными операциями. Несмотря на то, что ни один материал не был признан действительно биосовместимым, многие из них используются с низким или приемлемым риском осложнений [Hanson S., 1993]. Появление опасных для жизни гемолитических, токсических и иммунологических реакций учитываются при разработке медицинских изделий. Наиболее частыми осложнениями при использовании биоматериалов являются тромботические и тромбоэмболические осложнения, а также риски кровотечений, связанные с необходимой антикоагулянтной терапией [Gorbet M., Sefton M., 2004].

1.4.2. Механизмы тромбообразования

Эндотелиальные клетки - первый барьер между кровью и внесосудистым пространством, влияющий на структурную и функциональную целостность кровообращения [Jaffe E., 1987]. Эндотелиальные клетки обладают антитромботическими свойствами (секретируя, в том числе, гепарансульфат), а также участвуют в образовании тромбоцитарных и фибриновых тромбов (посредством продукции фактора фон Виллебранда, тканевого фактора), синтезируют и секретируют активаторы и ингибиторы плазминогена и т.д. [Libby P., Simon D., 2001].

Эндотелиальный гликокаликс препятствует тромбообразованию благодаря проявлению противосвертывающей активности за счет связывания с антикоагулянтными медиаторами: антитромбин, кофактор гепарина II, тромбомодулин и ингибитор пути тканевого фактора. В частности, антитромбин является мощным ингибитором тромбина и активированных факторов Ха и IXa – главными ключевыми факторами внутреннего пути каскада коагуляции [Reitsma S. et al., 2007].

Тканевый фактор играет решающую роль в инициации образования тромбина, вызванного воспалением. Комплекс фактора VIIa с тканевым фактором активирует фактор X, превращая его в фактор Ха; фактор Ха генерирует тромбин (фактор IIa), а тромбин участвует в образовании фибрина из фибриногена. Активация коагуляции при тромбозе глубоких вен подтверждается более высокими концентрациями D-димера (фрагменты молекулы фибрина) в результате массивной генерации фибрина с последующей плазмин-опосредованной деградацией фибрина/фибриногена [Ghozlan M. et al., 2015]

На первом этапе внутрисосудистого тромбообразования задействован тканевой фактор, продукция которого активируется после повреждения сосудов или распада атеросклеротической бляшки. Воспаление усиливает продукцию и активность тканевого фактора, способствуя дальнейшему воспалению за счет образования провоспалительных фрагментов фибрина, VIIa, Ха и тромбина [Labarrere C. et al., 2020].

Венозная тромбоэмболия (ВТЭ) является третьей по частоте причиной смертности во всем мире и включает тромбоз глубоких вен (ТГВ) и тромбоэмболию легочной артерии (ТЭЛА) [Wendelboe A., Raskob G., 2016]. Реже тромбоз поражает другие вены, включая вены верхних конечностей, венозные синусы головного мозга, брыжеечные, почечные и печеночные вены.

Венозные тромбы состоят преимущественно из фибрина и эритроцитов [Walton B. et al., 2015]. Сильные факторы риска ВТЭ, такие как хирургическое вмешательство, травмы и неподвижность, активируют прокоагулянтные белки и запускают строго регулируемую петлю обратной связи, которая, в конечном итоге, генерирует и организует нити фибрина, характеризующие венозный тромбоз. Антикоагулянтные препараты, используемые для предотвращения венозного

тромбоза, нацелены на прокоагулянтные белки и подавляют их активность, предотвращая образование фибриновых сгустков. По мере того, как сгустки проникают в более крупные и проксимальные сосуды, увеличивается риск эмболизации. Сгустки образуют эмболию, проходят через последовательно увеличивающиеся вены, возвращая кровь к сердцу и в легочную сосудистую сеть. Далее эмболы попадают в легочные артерии меньшего размера, где сужение просвета сосуда ограничивает прохождение сгустка, что препятствует нормальной циркуляции крови [Nicholson M. et al., 2020].

В качестве фармакологических средств, используемых для профилактики ВТЭ, применяют антикоагулянты, которые снижают риск ВТЭ на 50–80%. Однако, все стратегии венозной тромбопрофилактики, основанные на использовании антикоагулянтов, увеличивают риск кровотечений. В связи с этим, венозная тромбоземболия и связанные с ней инвалидизация, смертность и финансовая составляющая, включая госпитализацию и лечение, на сегодняшний день представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения и экономики страны [Nicholson M. et al., 2020].

Биоматериалы не должны активировать механизмы коагуляции и способствовать образованию тромбов в сосудах [Franz S. et al., 2011]. После первого контакта имплантата с тканями реципиента белки крови и интерстициальной жидкости прикрепляются к поверхности биоматериала. Этот слой адсорбированных белков регулирует активацию коагуляции, системы комплемента, тромбоцитов и иммунных клеток, а также осуществляет их взаимодействие, приводящее к образованию матрикса и воспалительному ответу [Gorbet M., Sefton M., 2004; Wilson C. et al., 2005; Franz S. et al., 2011]. Поверхностная активация фактора XII, связанного с адсорбированными белками, и присутствие фактора VII на клеточных мембранах моноцитов и макрофагов, инициируют активацию каскада коагуляции, заканчивающегося образованием тромбина и фибрина, и, как итог, тромбообразованием. Фибриноген также спонтанно адсорбируется на поверхности биоматериала и способен активировать моноциты/макрофаги через связывание интегринов, инициируя воспалительную реакцию [Labarrere C. et al., 2020].

Основными участниками иммунного ответа являются моноциты и макрофаги. Моноциты, достигающие места имплантации биоматериала, дифференцируются на субпопуляции макрофагов, участвующих в воспалении, заживлении ран и регенерации тканей [Labarrere C. et al., 2020].

Активированные фибробласты синтезируют коллаген, что приводит к инкапсуляции биоматериала. Дендритные клетки являются основными участниками как врожденного, так и адаптивного иммунитета и могут вызывать толерогенный эффект на биоматериалы, высвобождая интерлейкин-10 [Franz S. et al., 2011]. Индуцирование толерогенных свойств биоматериалов является многообещающей стратегией подавления иммунных ответов реципиента и устранения воспалительных реакций.

Взаимодействие Т-клеток с макрофагами способствует адгезии и слиянию последних [Brodbeck W. et al., 2005; Franz S. et al., 2011], а начальный провоспалительный ответ на биоматериалы, заключающийся в высвобождении интерлейкина-1 β (IL-1 β) и фактора некроза опухоли α (TNF- α), со временем переключается в сторону высвобождения интерлейкина-10, матриксной металлопротеиназы-9 и тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ 1 и 2, способствующих ремоделированию внеклеточного матрикса [Chang D. et al., 2008]. Структура внеклеточного матрикса обеспечивает основу для клеточной структуры, а присутствие фибрина, коллагена и эластина обеспечивает прочность и эластичность. Белковый каркас ковалентно связан с отрицательно заряженной матрицей сульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ), которые взаимодействуют с факторами роста (тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и трансформирующим фактором роста- β (TGF- β)), снижая их чувствительность к ферментативному расщеплению и создавая особую клеточную среду, регулирующую регенерацию тканей [Chen Q. et al., 2007]. Внеклеточный матрикс также регулирует поведение клеток, позволяя взаимодействовать с другими клетками и внеклеточными компонентами, протеолитическими ферментами и сигнальными молекулами, связанными с восстановлением тканей, ответом реципиента на биоматериалы и консолидацией биоматериалов [Franz S. et al., 2011].

Несмотря на то, что биоматериалы инертны и не отторгаются организмом хозяина, изменение клеточной адгезии к белковому слою, адсорбированному на биоматериале [Dinnes D. et al., 2007], может изменять клеточные реакции. Например, поверхность биоматериала, модифицированная полиэтиленгликолем, может препятствовать прикреплению и активации клеток [VandeVondele S. et al., 2003], препятствуя надлежащему заживлению ран. Облегчение связывания биоматериала с факторами роста, такими как VEGF, TGF- β и PDGF, может регулировать адгезию, миграцию, пролиферацию и дифференцировку фибробластов, гладкомышечных клеток и других типов, улучшая заживление ран [Barrientos S. et al., 2008]. Кроме того, факторы роста могут участвовать в поддержании антитромботической среды, через сульфатированные гликозаминогликаны, способствуя их связыванию с интерлейкином-10 (IL-10) [Salek-Ardakani S. et al., 2000] и повышая активность клеток вокруг биоматериалов, влияющих на интеграцию [Franz S. et al., 2011].

Антикоагулянты являются основой терапии для профилактики и лечения тромбозов. Антикоагулянтные агенты могут ингибировать тромбообразование, изменяя различные пути внутри каскада коагуляции или напрямую воздействуя на тромбин, уменьшая его образование. Однако непрямые ингибиторы нацелены на кофакторы плазмы, такие как антитромбин, и связываются с ними, катализируя их взаимодействие с ферментами свертывания крови. Несмотря на то, что антикоагулянты активно используются для профилактики образования тромбов и тромбоемболий, их использование часто связано с побочными эффектами и увеличением частоты повторных госпитализаций [Budnitz D. et al., 2011].

1.4.3. Гепарин – природный гликозаминогликан с антикоагулянтным действием

Гепарин - высокосульфатированный полисахарид, принадлежащий к семейству гликозаминогликанов. Он задействован в разных биологических функциях. Основная его биологическая цель - подавление каскада коагуляции для поддержания кровотока в кровяном русле [Bolten S. et al., 2018].

Активность гепарина связана с его взаимодействием с различными белками. В кровотоке гепарин связывается через пентасахаридную последовательность с ингибитором тромбина - антитромбином [Rosenberg R., Damus P., 1973]. Гепарин усиливает его антикоагулянтную активность, что в итоге ингибирует активность тромбина и фактора свертывания Ха, тем самым подавляя свертывание крови [Holmer E. et al., 1981]. Гепарин соединяется с факторами, связанными со свертыванием крови, такими как кофактор гепарина II, фактор тромбоцитов IV и ингибитор протеина C. Кроме того, гепарин связывается с факторами роста, факторами адгезии и факторами метаболизма с высокой аффинностью [Lobb R. et al., 1986]. Гепарин синтезируется в тучных клетках соединительной ткани и хранится в гранулах в сочетании с гистамином и серглицином [Frieri M., Metcalfe D., 1983]. Основываясь на этих свойствах, физиологическая роль гепарина включает в себя модуляцию иммунного ответа и воспалительных реакций, а также антикоагулянтную активность.

Гранулы тучных клеток содержат обновляемые медиаторы, такие как: биогенные амины — гистамин и серотонин; протеогликаны — серглицин и др.; гликозаминогликаны — гепарин, гепарансульфат и др. [Moon T. et al., 2010]. В составе секрета тучных клеток обязательными компонентами являются гепарин, гистамин, нейтральные протеазы и цитокины. Наличие гепарина в гранулах характерно только для тучных клеток, тогда как в других клетках содержатся прочие гликозаминогликаны [Moon T. et al., 2014]. Субстратами для биосинтеза гепарина являются глюкоза и неорганический сульфат. Его биосинтез осуществляется вне матрикса, поскольку любые дефекты системы ферментов биосинтеза могут приводить к нарушениям структуры матрикса тучных клеток. Ферменты биосинтеза локализованы в аппарате Гольджи и собраны в единый белковый комплекс, называемый ГАГасомой. В метаболизме гепарина участвует фермент гепариназа, расщепляющая его молекулу [Dagälv A. et al., 2011; Chelombitko M. et al., 2016].

Гепарин представляет собой линейный, полидисперсный, микрогетерогенный полисахарид, состоящий из повторяющихся дисахаридных единиц α -1-идуроновой или β -d-глюкуроновой кислоты, 1,4-гликозидно связанных с α -d-глюкозаминовыми остатками, селективно модифицированный O- и N-сульфо

и N-ацетил группами [Linhardt R., 2003]. Этот поликомпонентный агент имеет сложную структуру и проявляет ряд биологических и фармакологических активностей. Гепарин, полученный из тканей животных, называемый НФГ, в основном используется в качестве внутривенного агента с относительно коротким периодом полураспада [Baglin T. et al., 2006]. Ткань кишечника свиней является основным источником гепарина во всем мире [Linhardt R., 2003].

НФГ вводят путем внутривенной инфузии или подкожной инъекции, предпочтительнее - внутривенное введение [Weitz D., Weitz J., 2010]. НФГ легко связывается с белками плазмы, что способствует его переменному антикоагулянтному ответу после парентерального введения. При внутривенном введении быстро достигаются терапевтические концентрации в плазме, которые можно эффективно контролировать и регулировать в зависимости от скорости инфузии [Weitz D., Weitz J., 2010]. Выведение НФГ зависит от введенной дозы и происходит посредством двух независимых механизмов [Bussey B., Francis J., 2004]. Начальная фаза - быстрое и насыщенное связывание с эндотелиальными клетками, макрофагами и локальными белками, где НФГ деполимеризуется. Вторая фаза - медленный, ненасыщаемый, опосредованный почками клиренс. В терапевтических дозах НФГ выводится посредством деполимеризации, при этом цепи с более высокой молекулярной массой удаляются быстрее, чем аналоги с более низкой массой. Поскольку клиренс становится зависимым от почек, увеличенное или продолжительное дозирование НФГ обеспечивает непропорциональное увеличение как интенсивности, так и продолжительности антикоагулянтного эффекта [Alquwaizani M. et al., 2013].

Основные осложнения терапии НФГ включают кровотечение (сильное кровотечение, 0–7%; смертельное кровотечение, 0–3%) и гепарин-индуцированную тромбоцитопению (ГИТ, 1–5%). Пациенты, получающие НФГ в течение более 1 месяца, также подвержены повышенному риску остеопороза и развития переломов позвонков (примерно 2% случаев) [Schulman S. et al., 2008; Weitz D., Weitz J., 2010].

Низкомолекулярные гепарины (НМГ) получают из нефракционированного гепарина путем его контролируемой химической или ферментативной деполимеризации. Данный химический процесс снижает среднюю молекулярную массу (MW) гепарина примерно от 18000 Да до 4000 Да [Chen J. et al., 2019]. НМГ

обладают высокой биодоступностью после подкожной инъекции, почечным клиренсом, который не зависит от дозы, и более длительным периодом полувыведения (17–21 час) по сравнению с нефракционированным гепарином (НФГ). Эти особенности фармакокинетики НМГ обусловлены более низкой способностью связываться с белками плазмы, эндотелием и макрофагами по сравнению с НФГ. НМГ требуют меньшего количества инъекций и вызывают меньше побочных эффектов. У госпитализированных пациентов, получающих тромбопрофилактику, НМГ ассоциировался с более низким риском тромбоза глубоких вен (ТГВ), уменьшением количества гематом в месте инъекции и отсутствием различий в кровотечении по сравнению с НФГ [Wein L. et al., 2007]. Кровоизлияние является основным осложнением НМГ, при этом некоторые данные подтверждают снижение частоты кровотечений по сравнению с НФГ. Частота смертельных кровотечений составляет 0–0,8%, крупных кровотечений - 0–3% пациентов [Schulman S. et al., 2008].

1.4.4. Эффекты гепарина на показатели гомеостаза клеток, опосредованные его связыванием с биомолекулами

Первичная микроструктура фибринового сгустка состоит из неупорядоченной сети разветвляющихся волокон фибрина [Nenci G. et al., 1992; Undas A. et al., 2006]. Гепарин и гепарансульфаты состоят из повторяющихся дисахаридных звеньев с сильно изменяющимся характером сульфатирования. Сульфатирование чаще всего происходит по N-, 2-O- и 6-O-группам, отвечающие за взаимодействие с факторами роста или адгезивными белками [Ling L. et al., 2016]. Будучи отрицательно заряженным, высокосульфатированным и полидисперсным глюкозаминогликаном, гепарин проявляет высокое сродство к связыванию с широким спектром положительно заряженных белков [Hirsh J. et al., 2001]. В исследовании Roger Y. et al. (2020) удалось показать, что совместное применение гепарина с ММСК костного мозга успешно предотвращало коагуляцию клеток *in vivo*, что может указывать на роль гепарина в процессах клеточной коагуляции и адгезии [Roger Y. et al., 2020].

Реакция заживления, инициированная биоматериалами, имплантированными в живые ткани, сопровождается воспалительным ответом, прикреплением к поверхности материала белков крови и интерстициальных жидкостей. Белки крови (в том числе факторы свертывания крови, тромбин, тканевой фактор и др.) регулируют активацию тромбоцитов, иммунных клеток, процесс коагуляции и системы комплемента, что в конечном итоге приводит к образованию внеклеточного матрикса, который в дальнейшем будет являться субстратом для ММСК.—Laner-Plamberger S. et al. (2019) продемонстрировали интернализацию гепарина и его деградацию в лизосомах стромальными клетками в зависимости от тканевого источника, тем самым вызывая не только экспрессию генов дифференцировки, но и экспрессию белков и их фосфорилирование [Laner-Plamberger S. et al., 2015].

Гепарин в составе пористых скеффолдов коллагена I типа/ГАП в малой концентрации (30 мг/г коллагена) способствовал *in vitro* росту капиллярной сети из эндотелиальных клеток пупочных вен человека и ее вращанию в поры композитного материала. При более высокой концентрации (150 мг/г коллагена) гепарин ингибировал данный процесс. Кроме того, антикоагулянт тормозил ангиогенный эффект эндотелиального фактора роста (VEGF) [Quade M. et al., 2017].

Kanzaki S. et al. (2011) продемонстрировали, что гепарин оказывает двойственное влияние на индуцированную костным морфогенетическим белком 2 (BMP2) остеогенную активность в клетках MC3T3-E1 (клетки-предшественники остеобластов, полученные из *Mus musculus calvaria*). С одной стороны, гепарин снижает остеогенный потенциал после короткого времени (после 24 и 48 часов культивирования) воздействия на клетки, а с другой, поддерживает его после более длительного (144 часа культивирования) периода [Kanzaki S. et al., 2011].

Takada T. et al. (2003) показали, что сульфатированные полисахариды, такие как гепарин, усиливают биологическую активность BMP [Takada T. et al, 2003]. Более того, в исследовании Zhao B. et al. (2006) сообщалось, что гепарин усиливает индуцированную BMP дифференцировку остеобластов *in vitro* и *in vivo*, защищая BMP2 от деградации и ингибируя антагонисты BMP [Zhao B. et al., 2006]. Стромальные клетки костного мозга, выращенные на обработанной гепарином

поверхности, имели повышенную минерализацию и активность щелочной фосфатазы (ЩФ) [Mathews S. et al., 2014].

Из примерно 40 цитокинов суперсемейства TGF- β около трети связываются с гепарином, в том числе, TGF- β 1, TGF- β 2, некоторые представители BMPs (например, BMP-2; BMP-6), факторы роста и дифференцировки (GDFs), а также GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor) и два его близких гомолога [Rider C.C., Mulloy B., 2017]. Высокое сродство гепарина к факторам роста, таким как VEGF, основному FGF и BMP-2, делает его потенциальным носителем для доставки и локального нацеливания данных биомолекул [Kim J.Y. et al., 2015].

Так, клиническое применение BMP-2, одной из наиболее активных остеоиндуктивных молекул, требует применения супрафизиологических доз, вследствие ее нестабильности и быстрой ферментативной деградации, которые обуславливают системную токсичность и побочные эффекты применения [Kim S. et al., 2018]. Lee J.S. et al. (2015) разработали систему с гепарин-конъюгированным фибрином (HCF) для доставки рекомбинантного BMP-2 человека при биоинженерии костной ткани [Lee J.S. et al., 2015]. Позднее был разработан носитель на основе гепарина и полиэлектrolита (PEC) для доставки BMP-2 [Wang M. et al., 2016].

Бесклеточные гепаринизированные минерализованные мембраны из подслизистой оболочки, насыщенные BMP-2, обладали контролируемым долгосрочным 40-дневным высвобождением костного протеина, способствовали экспрессии остеогенных генов *in vitro* в МСК костного мозга и заживлению костного дефекта челюсти у остеопорозных крыс. При этом гепарин использовался для улучшения иммобилизации и контролируемого выделения BMP-2 [Sun T. Et al., 2018].

Многолетние исследования влияния гепарина на мезенхимные клетки, проведенные на животных моделях и в исследованиях *in vitro*, дали противоречивые результаты. Однако было обнаружено, что эффекты гепарина на здоровые пролиферирующие клетки и ткани зависят от его концентрации. Так, стимулирующее действие на пролиферацию клеток гепарин оказывает в низких и очень низких концентрациях, а с увеличением концентрации он тормозит клеточную пролиферацию [Susanto A. et al., 2019] (**рис. 1**). По данным Khan S.A. и

соавт. (2008), опухолевые клетки, напротив, отвечают на гепарин усилением пролиферации и ослаблением дифференцировки через опосредованные BMP-4 сигнальные пути [Khan S.A. et al., 2008] (рис. 1).

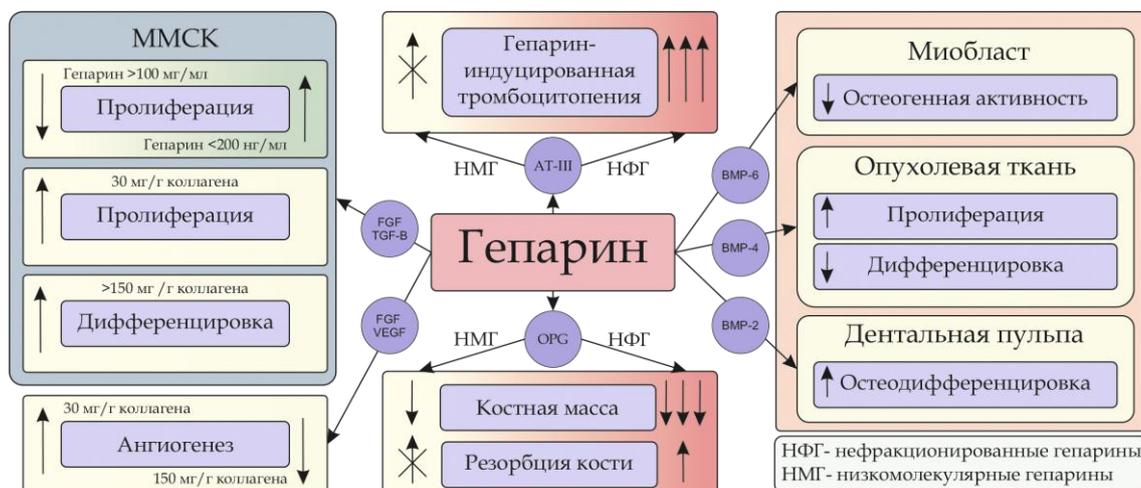


Рисунок 1. Эффекты гепарина, используемые для доставки биомолекул при инженерии тканей. АТ-III- Антитромбин III; BMP-2- Костный морфогенетический белок 2; BMP-4- Костный морфогенетический белок 4; BMP-6- Костный морфогенетический белок 6; FGF- Фактор роста фибробластов; OPB - Остеопротегерин; TGF-В- Трансформирующий ростовой фактор бета-1; VEGF- Фактор роста эндотелия сосудов; МСК - мезенхимные стволовые клетки (адаптировано из Литвинова Л.С. и др., 2020).

Связывание гепарина с морфогенетическими белками кости (BMPs) приводит к ограничению остеогенной активности BMP-6 в 72-часовой культуре миобластов, зафиксированному по снижению экспрессии щелочной фосфатазы и остеокальцина. В тесте эктопического образования кости и хряща у остеопорозных мышей гепарин также значительно подавлял регенеративную активность BMP-6. Это позволяет предположить, взаимодействие с BMP-6 является одним из механизмов гепарин-ассоциированного остеопороза [Brkljasic J. et al., 2013] (рис. 1). С другой стороны, гепарин *in vitro* стимулировал остеогенную дифференцировку клеток дентальной пульпы человека, проявляющуюся уже с 3-х суток культивирования и характеризующуюся увеличением активности щелочной фосфатазы, экспрессии морфогенетического белка кости (BMP-2) и остеокальцина,

формированием узелков минерализации внеклеточного матрикса ЭЦМ [Rodrigues E.M. et al., 2019] (рис. 1).

Модификация гепарином пористых композитных матриц (скаффолдов) из коллагена I типа и гидроксиапатита (ГАП) показала зависимость его эффекта от дозы, но не от способа включения в состав скаффолда. В малом количестве (30 мг/г коллагена) гепарин стимулировал пролиферацию, а в большой концентрации (150 мг/г коллагена) - остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека [Quade M. et al., 2017].

Выявлена индивидуальная чувствительность пролиферации МСК костного мозга человека, полученных от разных доноров, к малым дозам гепарина (менее 200 нг/мл) и его плеитропное действие на сигнальные пути клеточного роста и дифференцировки (включающие суперсемейства трансформирующего фактора роста-бета (TGF- β) и BMPs, факторов роста фибробластов (FGFs), Wnts). В свою очередь, высокие дозы гепарина (100 мкг/мл и более) оказывали однозначно ингибирующее действие на клеточный рост [Ling L. et al., 2016].

In vitro гепарин способен усиливать остеокластическую резорбцию кости, ингибируя активность остеопротегерина (OPG) [Irie A. et al., 2007]. Гепарин специфически связывался с OPG и предотвращал его взаимодействие с RANKL на мембране остеобластов, способствуя тем самым взаимодействию RANK-RANKL и активации остеокластов. Препараты НМГ (с массой приблизительно 4000–6000 Да) вызывали менее выраженный остеопорозный эффект, чем НФГ стандартного размера (приблизительно 7000–25 000 Да). Более активное ингибирование OPG под действием НФГ, по-видимому, связано с тем, что его молекулы являются более объемными и стерически препятствуют взаимодействию OPG – RANKL [Irie A. et al., 2007]. Таким образом, способность гепарина связывать остеогенные и ангиогенные биомолекулы является перспективным свойством для разработки систем их доставки и контролируемого длительного высвобождения. В то же время, проблемой является собственный неоднозначный потенциал гепарина как модулятора osteo- и ангиогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки представляют собой пул клеток, происходящий из мезодермальных тканей. В настоящее время использование ММСК для восстановления тканей имеет многообещающие перспективы в различных областях медицины, в том числе при повреждениях скелета. Широкое применение ММСК в регенеративной медицине обусловлено потенциалом дифференцировки в одно из ортодоксальных направлений (остеогенное, хондрогенное, адипогенное), способностью клеток к хоумингу в очаг повреждения, индукцией ангиогенеза.

Имплантаты представляют собой трехмерные структуры, способствующие адгезии, выживанию, миграции и пролиферации клеток, ускоренному ремоделированию кости, а также обладают свойством остеокондуктивности [Kangari P. et al., 2020]. Использование трехмерной (3D) пространственной организации клеточной культуры *in vitro*, которая осуществляется за счет внесения в среду культивирования трехмерного матрикса, позволяет изучать клеточные реакции в условиях, приближенных к физиологическим параметрам клеточной жизнедеятельности [Коршунов Д., Кондакова И., 2016]. Гепарин является физиологическим медиатором, который продуцируется тучными клетками и оказывает модулирующее действие на разные типы клеток, в частности, регулирует процессы дифференцировки. Существует потребность в исследовании влияния прямых антикоагулянтов на культуру ММСК-ЖТ человека при моделировании процессов физиологической регенерации костной ткани в связи с тем, что существующие на сегодняшний день данные являются неоднозначными.

Таким образом, показано, что гепарин опосредованно регулирует клеточную судьбу и может определять направленность дифференцировки. Важно отметить, что дифференцировка в одно из ортодоксальных направлений – это результат многофакторного влияния клеточного микроокружения, хоуминга (адгезии, миграции) клеток и межклеточных взаимодействий, которые модулируются молекулами гепарина и до конца не изучены.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект и материал исследования

2.2.1. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

В качестве объекта исследования были использованы мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), выделенные из липоасpirата подкожной жировой ткани человека. Работа с культурами мезенхимальных стромальных клеток, полученными из подкожной жировой клетчатки человека, 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.). *Критериями для 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.

2.1.2. Титановые образцы с кальцийфосфатным покрытием

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 (ТiКФ); 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 гидроксиапатита

(ГАП) (диаметр частиц 40–100 нм) получали механохимическим способом, описанным ранее [Chaikina M. et al., 2004]. Присутствие фосфатов кальция в составе покрытия (небольшие пики бета-кальцийпирофосфата (β -Ca₂P₂O₇) и монетита (CaHPO₄)) было подтверждено рентгенодифракционным анализом. Нановзесь ГАП, помимо нанесения покрытия на титановые подложки, использовалась в системе клеточного анализа в реальном времени (RTCA) для определения его влияния на инвазию и пролиферацию ММСК-ЖТ человека в присутствии прямого антикоагулянта. TiКФ-образцы помещались в лунки культуральных планшетов вертикально вдоль бортика лунки, тем самым, моделируя дистантное сокультивирование с ММСК-ЖТ человека.

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. Поверхность титановых образцов с КФ-покрытием была изучена при помощи оптической (инвертированный металлографический микроскоп Olympus GX-71, Olympus Corporation, Japan) и сканирующей электронной микроскопии (Philips SEM 515, Нидерланды) в Томском материаловедческом центре.

Основополагающими элементами структуры КФ-покрытий являются сферолиты (диаметр до 20 мкм), формирующие скаффолд-подобный (толщиной до 75 мкм) слой и углубления между сферолитами (глубиной до 20 мкм и шириной до 50 мкм) (**рисунок 2**). Максимальная высота профиля между сферолитами и углублениями (R_{max} по ГОСТ 2789–73) составляет 30–40 мкм. Сферолиты имели внутренние полости, переходящие в глубокие, взаимосвязанные поры (диаметром до 12 мкм). Аналогичная топография участков КФ-поверхности была названа остеогенной “нишей-рельеф” [Хлусов И. и др., 2011]. Поверхность с такими характеристиками индуцирует дифференцировку ММСК-ЖТ человека в сторону остеобластов [Литвинова Л. и др., 2019], что достигается путем моделирования структурно-функционального состояния минерального матрикса в фазу остеорезорбции во время формирования остеокластами блюдцеобразных углублений на поверхности кости глубиной до 40 мкм и растворения молекул гидроксиапатита до фосфатов кальция.

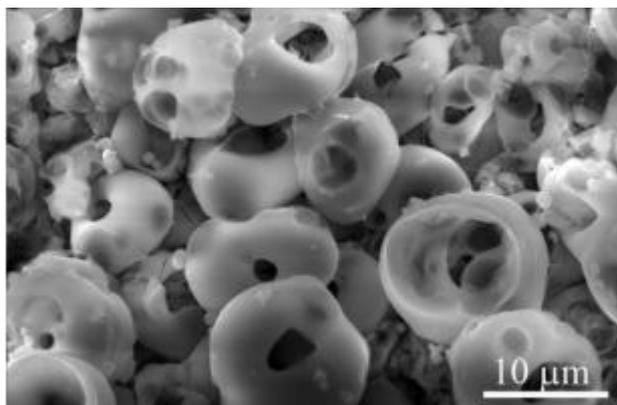


Рисунок 2. Электронно-микроскопическое изображение типичной топографии микродугового шероховатого КФ-покрытия

Нанопорошок ГАП и изготовленные TiKФ-образцы предварительно подвергались стерилизации в сухожаровом шкафу (Sanyo, Япония) при 160°C в течение 90 минут перед *in vitro* исследованиями.

2.1.3. Прямой антикоагулянт

В качестве прямого антикоагулянта в данном исследовании был выбран гепарин (Белмедпрепараты, Республика Беларусь), клинически разработанный для оптимизации антикоагулянтного эффекта при одновременном снижении системной токсичности [Banik N. et al., 2021]. Дозы гепарина, используемые в эксперименте, были выбраны с критерием его 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]. Таким образом, основываясь на данных литературы и собственных экспериментальных результатах, из протестированных концентраций гепарина - 0,5 – 0,75 – 1 МЕ/мл, достоверные изменения (при условии сохранения высокой жизнеспособности клеточной культуры) изучаемых нами параметров, были выявлены только при действии на ММСК-ЖТ человека - 1 МЕ/мл (8 мкг/мл) гепарина; данная концентрация была в дальнейшем использована в настоящем *in vitro* исследовании.

2.2. Методы исследования

Для решения задач настоящего исследования был разработан дизайн, позволяющий оценить морфофункциональные реакции ММСК-ЖТ человека в условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани в присутствии прямого антикоагулянта (гепарина, 1 МЕ/мл).

Блок-схема дизайна исследования схематично представлена на **рисунке 3**.

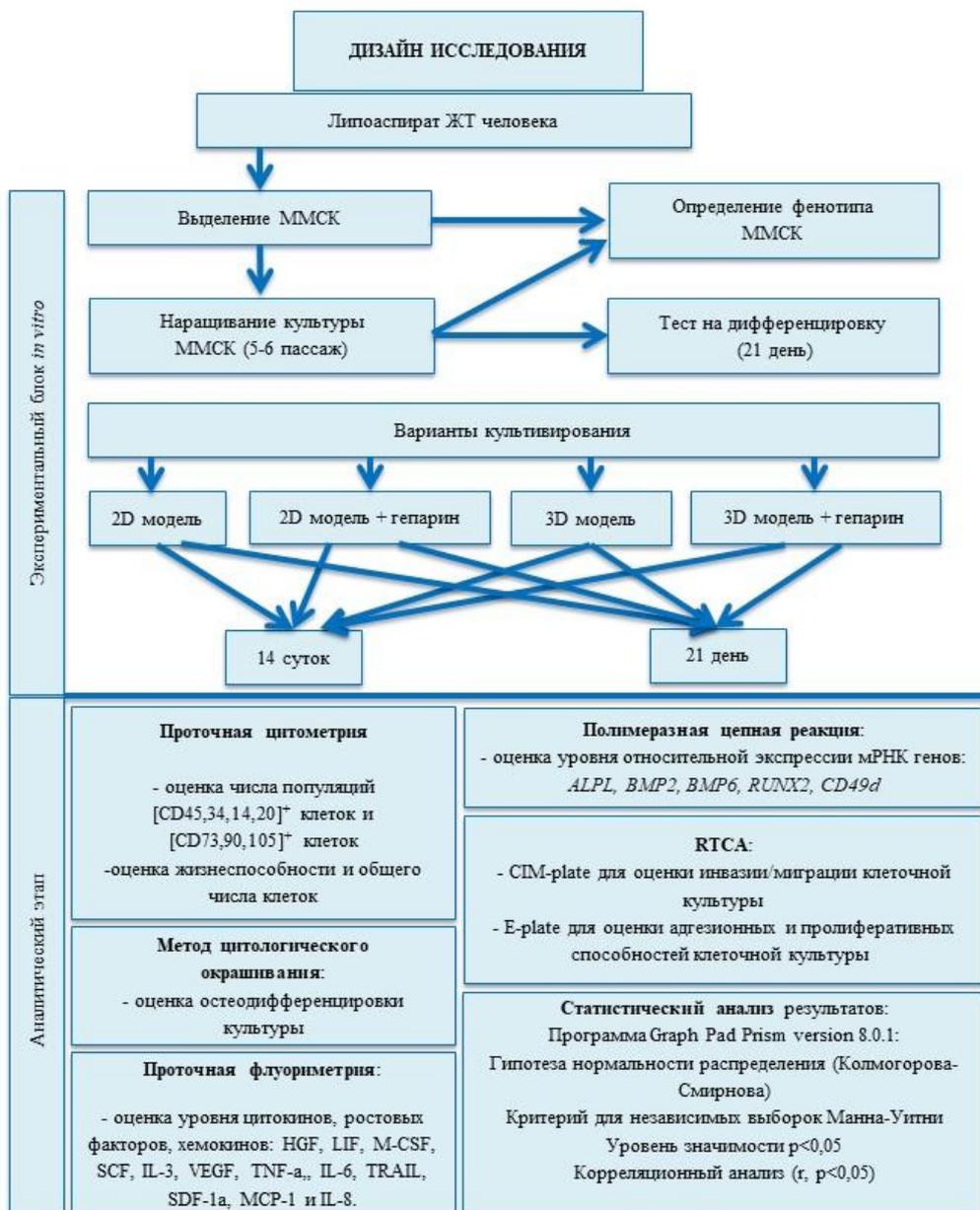


Рисунок 3. Блок-схема дизайна эксперимента

2.2.1. Выделение культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из липоасpirата жировой ткани человека

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

Стромально-васкулярную фракцию с примесью эндотелиальных клеток, перicyтов и гладкомышечных клеток получали методом, описанным ранее [Zuk P. et al., 2001]. Выделенная ткань (объем 50 мл) 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). После ферментативной обработки несколько раз отмывали стромально-васкулярную фракцию с использованием фосфатно-солевого буфера (PBS, Sigma-Aldrich, США). 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-глутамин (Sigma-Aldrich, США) - 280 мг/л, гентамицин (Invitrogen, Великобритания) - 50 мг/л. Стромально-васкулярную фракцию пересеивали 4 раза до достижения клеточной конfluэнтности (длительность пассажа 5-7 дней) для увеличения популяции культуры ММСК. Питательную среду сменяли каждые 3-4 дня. В эксперименте использовали адгезирующую к пластику культуру после 5 пассажа. Для открепления адгезированных клеток от поверхности пластика, флаконы с культурой ММСК промывали 3 раза раствором PBS по 4 мл, затем монослой клеток ферментировали 3 мл 0,05% раствора трипсина (Sigma-Aldrich, США) в 0.53 мМ этилендиоксидтетрауксусной кислоты (ЭДТА, Sigma-Aldrich, США) и инкубировали 5 мин при 37°С, после чего промывали флаконы раствором Хенкса, содержащего 20% ЭТС, собирали клеточную взвесь в пробирку

для микроцентрифуги. Далее отмывали дважды центрифугированием с PBS в течение 5 мин при 1200 об/мин (300g). После центрифугирования удаляли надосадок и доводили клеточную взвесь в осадке до 1 мл питательной средой.

2.2.2. Подсчет общего числа клеток в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, а также оценка жизнеспособности культуры

Определение жизнеспособности клеток и подсчет общего числа до и после культивирования производилось на слайдах с использованием автоматического счётчика клеток Countess TM Automated Cell Counter (Invitrogen, США). Для подсчета общего числа клеток, отбирали 5 мкл клеточной суспензии и смешивали с 5 мкл раствора 0,4% трипанового синего. Полученный смешанный образец помещали в камеру рабочего слайда (толщина 100 мкм), который размещался в гнезде прибора. Подсчет производился автоматически с выведением полученных результатов анализа на экране прибора. В исследование использовали культуры ММСК-ЖТ человека с жизнеспособностью не менее 90%.

2.2.3. Анализ дифференцировочной и фенотипической принадлежности выделенного пула клеток к культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

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]. Для доказательства принадлежности пула клеток к культуре ММСК учитывали совокупность следующих параметров:

- 1) жизнеспособность клеток не менее 90%;
- 2) способность клеток дифференцироваться в три основных направления: остеобластное, хондрогенное, адипогенное;
- 3) адгезия культуры к культуральному пластику;

4) экспрессия на поверхности клеток не менее 95 % поверхностных рецепторов, свойственных ММСК (CD73, CD90, CD105) и минимальная экспрессии (не более 2%) поверхностных маркеров, свойственных для гемопоэтических клеток (CD45, CD34, CD20, CD14).

По результатам подсчета числа мертвых/живых клеток в культуре ММСК-ЖТ человека, полученного с помощью автоматического счётчика клеток (Countess TM Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с использованием красителя Trypan blue 0,4% («Invitrogen», США), жизнеспособность клеток составила более 96%.

Методом проточной цитофлуориметрии была подтверждена принадлежность пула клеток к культуре ММСК. С использованием набора MSC Phenotyping Kit human (Miltenyi Biotec, Германия) было установлено, что более 94% адгезивных клеток в совокупности экспрессировали поверхностные маркеры CD73 (99,28%), CD90 (94,72%) и CD105 (96,54%) при минимальной (0,45%) экспрессии маркеров, свойственных гемопоэтическим клеткам (CD45, CD34, CD20 и CD14).

Для проверки способности выделенной популяции клеток к дифференцировке в трех основных направлениях, клетки ($0,15 \times 10^4$ кл/мл) культивировали в течение 21 суток в 6-ти луночных планшетах в 3 мл полной питательной среды (ППС) на основе базовой среды α MEM («Sigma-Aldrich», США) (контрольные пробы), а также на основе специализированных дифференцировочных сред. Смена среды производилась каждые 3-4 суток.

По результатам 21-суточного культивирования в специализированных дифференцировочных средах StemPro® Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific, США), клетки демонстрировали позитивную окраску на ализариновый красный (остеобласты), ализариновый синий (хондробласты), масляный красный (адипоциты) (**рисунок 4**). Интенсивность окраски сравнивали с контрольной культурой, культивируемой в стандартной питательной среде (α MEM, 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина, 0.3 мг/мл L-глутамин; Sigma-Aldrich, США) без дифференцировочных добавок. Также была показана способность клеточной культуры к адгезии на пластике с использованием методов фазово-контрастной микроскопии (**Рис. 4.4**).

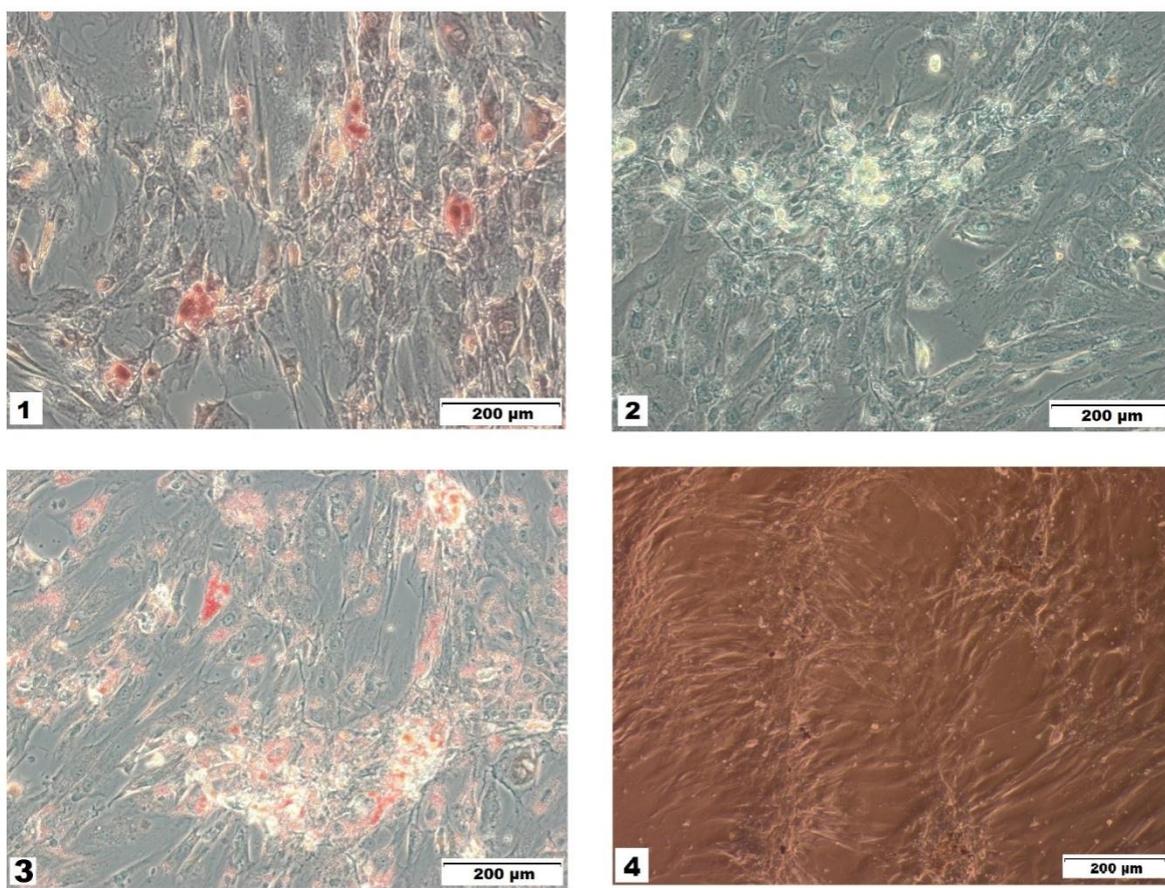


Рисунок 4. Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека после 21-суточного культивирования в дифференцировочных (1-3) средах, в стандартной среде без дифференцировочных добавок – контроль (4). 1- остеогенная среда (ализариновым красным окрашены участки минерализации межклеточного вещества); 2 - хондрогенная среда (альциановым синим окрашены гликопротеины); 3 - адипогенная среда (масляным красным окрашены участки нейтральных триглицеридов и липидов). Размер линейки — 200 мкм

Согласно проведенной дифференцировочной и фенотипической идентификации принадлежности выделенного пула клеток можно сделать вывод, что используемые в эксперименте клетки после 5-го пассажа соответствовали всем критериям, предъявляемым к культуре ММСК человека.

2.2.4. Экспериментальное культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в присутствии/отсутствии гепарина и/или остеозамещающего материала

В основе настоящего исследования лежит разработанная научным коллективом трехмерная модель культивирования *in vitro* (3D-модель), предполагающая создание условий активации ММСК-ЖТ человека под влиянием продуктов биodeградации трехмерного матрикса, имитирующего поверхностный рельеф кости в процессе регенерации костной ткани. Контрольной группой служила двухмерная (2D) модель культивирования культуры ММСК-ЖТ человека на пластике в стандартной питательной среде (α MEM, 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина, 0.3 мг/мл L-глутамина; Sigma-Aldrich, США). Согласно данным научной литературы, между 2D и 3D моделями культивирования клеток обнаружены существенные различия в их поведении [Dellatore S. et al., 2008] и генной экспрессии [Birgersdotter A. et al., 2005].

Культивирование ММСК-ЖТ человека проводилось в соответствии с задачами исследования, с соблюдением основных условий культивирования клеточной культуры: при 37°C, в 100% влажной атмосфере, в присутствии 5% CO₂. Для постановки эксперимента подготавливали 100 мл полной питательной среды (ППС) для культивирования (состав: α MEM («Sigma-Aldrich», США), содержащая: 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США), 280 мг/л L-глутамин («Sigma-Aldrich», США), пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) («Gibco Life Technologies», США)).

Для оценки морфофункционального состояния клеток, культивируемых в присутствии гепарина и остеозамещающих материалов, было сформировано 8 экспериментальных групп: 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 экспериментального культивирования был приготовлен гепариновый раствор (ГР): объем гепарина (Белмедпрепараты, Республика Беларусь) 10 мкл доводился до 1 мл полной питательной средой.

Искусственные матрицы (индекс шероховатости Ra=2-3 мкм) крепили к стенкам лунки 12-луночного планшета (Orange Scientific, Бельгия) с помощью клипсов для моделирования дистантного сокультивирования с ММСК-ЖТ человека. В каждую лунку добавляли минимальный необходимый объем ППС (500 мкл). Для формирования точки роста клеточной культуры, в планшеты вносили 14 мкл клеточной суспензии (10^5 клеток) в центр каждой лунки в соответствии с протоколом. Планшеты помещали в инкубатор на 24 часа для формирования монослоя клеток посредством клеточной адгезии. По прошествии суток добавляли в лунки соответствующий объем ГР и доводили общий объем до 2 мл полной питательной средой. Смену среды проводили каждые 3-4 суток: отбирали старую ППС, добавляли соответствующий объем новой ППС и ГР. Культивирование клеток в планшетах продолжалось 14 суток для определения уровня относительной экспрессии мРНК генов методом полимеразной цепной реакции и экспрессии поверхностных маркеров методом проточной цитофлуориметрии, а также 21 сутки для анализа дифференцировки ММСК-ЖТ человека с помощью методов цитологического окрашивания.

2.2.5. Оценка жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека методом проточной цитометрии

Благодаря дифференциальной проницаемости мембраны клеток для ДНК-связывающих красителей возможно разграничивать живые и мертвые клетки в любых клеточных суспензиях.

После культивирования культуры ММСК-ЖТ человека клеточные образцы тщательно ресуспендировали и отбирали 12,5 мкл, добавляли 125 мкл ViaCount Reagent (фактор разведения 10), тщательно ресуспендировали и оставляли на 5 минут при комнатной температуре в темном месте для инкубации. Оценку жизнеспособности в исследуемых культурах проводили методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия), согласно протоколу производителя (**рисунок 5**).

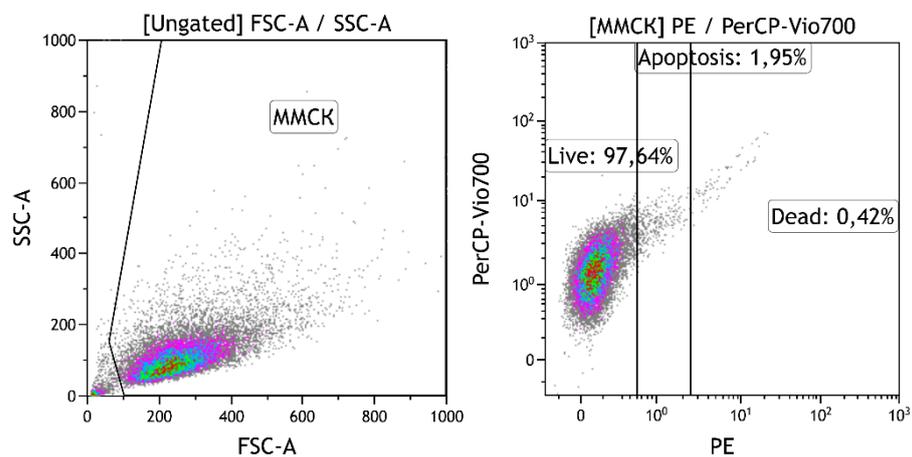


Рисунок 5. Стандартный протокол оценки жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток с использованием реагента «GuavaViacount» (Millipore, USA)

2.2.6. Анализ иммунофенотипа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека методом проточной цитометрии

Для анализа иммунофенотипа культур ММСК-ЖТ человека до и 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. Иммунофенотипирование культуры проводили с использованием набора MSC Phenotyping Kit human («Miltenyi Biotec», Германия). Использовали 2 коктейля, входящих в набор: первый содержал меченый изотипконтроль, необходимый для доказательства отсутствия неспецифического связывания антител; в состав второго входили антитела, соответствующие мультипотентным мезенхимальным стволовым клеткам (CD73, CD90, CD105) и гемопоэтическим клеткам (CD14, CD20, CD34, CD45) (**рисунок 6**).

Метод основан на детекции рассеивания света лазерного луча от клеток, окрашенных моноклональными антителами, мечеными флуоресцентными метками, при прохождении клеток через оптическую систему проточного цитофлуориметра. После культивирования для снятия культуры с культурального пластика, клетки подвергались ферментированию 0,05% трипсином («ПанЭко», Россия), разведенным в 0.53 мМ ЭДТА («Sigma-Aldrich», США), после чего

дважды отмывались фосфатным буфером. Далее культура подвергалась тщательному ресуспендированию автоматическим дозатором, после чего суспензия клеток объемом 0,05 мл была перенесена в микропробирки. В микропробирки вносили по 1 мкл коктейля антител в соответствии с рекомендациями протокола производителя. Инкубация клеток с антителами длилась 10 минут при температуре 4°C. Отмывка клеток проводилась центрифугированием (1500 об/мин) в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), в течение 5 минут при комнатной температуре. Надосадочную жидкость удаляли дозатором, затем доводили суспензию клеток фосфатно-солевым буфером до объема 0,2 мл.

Определение фенотипического профиля поверхностных маркеров ММСК проводили в 96-луночных планшетах на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия). Популяцию ММСК гейтировали в точечной диаграмме прямого (FSC, ось абсцисс) и бокового (SSC, ось ординат) светорассеивания. Относительную экспрессию целевых поверхностных маркеров детектировали по интенсивности флуоресценции в соответствующих набору координатах (флуоресценция по трем цветам на основе Dot Plot, или гистограммой) (рисунок 6). Число событий для каждого анализа составляло более 10.000 клеток. Анализ и обработка изображений с проточного цитофлуориметра проводилась с использованием автоматического программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США). Результаты оценки фенотипического профиля позволили установить, что более 94% клеток несли на своей поверхности маркеры CD73, CD90 или CD105; менее 0,45% клеток в исследуемой культуре экспрессировали маркеры гемопоэтических клеток (CD45, CD34, CD20 и CD14).

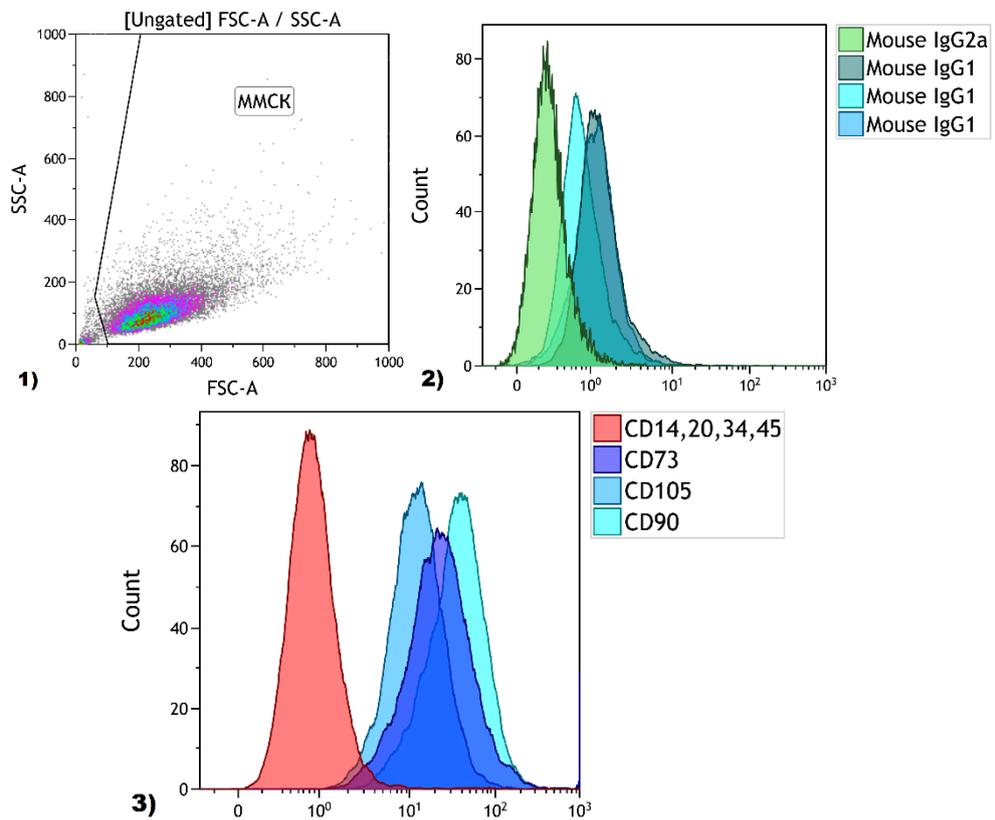


Рисунок 6. Стратегия гейтирования клеток. 1) Распределение клеток по боковому (SSC) и прямому (FSC) светорассеянию с формированием гейта MMCK; 2) Изотип контроль анализ с использованием гейтирования по MMCK. 3) Гистограммы распределения MMCK с использованием гейтирования по MMCK. Примечание для гистограмм 1 и 3: по оси ординат – количество событий, по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции

2.2.7. Определение уровня относительной экспрессии мРНК генов методом полимеразной цепной реакции

Для оценки уровня относительной экспрессии мРНК генов (*RUNX2* - Runt-related transcription factor 2, *BMP2* - Bone Morphogenetic Protein 2, *BMP6* - Bone Morphogenetic Protein 6, *ALPL* - Alkaline Phosphatase и *CD49d* - Integrin alpha 4) в культуре клеток по окончании срока культивирования (14 суток) из полученных нами образцов выделяли тотальную РНК с использованием реагента Extract RNA kit (Евроген, Россия) для лизиса клеток. Далее проводили инкубацию в течение 15 минут с последующим центрифугированием 10 минут 15 000 оборотов

(«Eppendorf», Centrifuge 5804R, Германия). Надосадочную жидкость с РНК в составе снимали и переносили в новую пробирку, добавляли хлороформ в объеме 200 мкл («Вектон», Россия). Смесь перемешивали вручную с периодичностью 10 секунд каждую минуту в течение 5 минут. Далее РНК-смесь центрифугировали при температуре 4°C, 15 000 оборотов в течение 15 минут. Затем РНК очищали методом спиртового осаждения: на первом этапе добавляли 100% изопропанола и центрифугировали 10 минут на скорости 12 000 оборотов, на втором этапе в микропробирки добавляли 1 мл 80% этанола и центрифугировали 5 минут на скорости 13.000 оборотов. Спирт аккуратно отбирали из микропробирок с последующим высушиванием микропробирок в течение 7 минут. Далее осадок растворяли в свободной от РНКаз воде в объеме 30 мкл. Чистоту РНК оценивали на спектрофотометре (Nanovue Plus, «GE Healthcare» Bio-Sciences, Швеция). Качество РНК идентифицировали методом гель-электрофореза по соотношению плотности бэндов 28S/18S рибосомальных субъединиц.

Исследуемые образцы тотальной РНК доводились до одинаковой концентрации (10 мкг/мл) водой, свободной от РНКаз и ДНКаз. Для каждого образца была приготовлена реакционная смесь, содержащая РНК-матрицу (15 мкл) и праймер oligo(dT)23-primer (7,5 мкл) («Beagle», Россия) для проведения реакции обратной транскрипции с целью получения ДНК-матриц. Далее пробирки с исследуемыми образцами помещали в амплификатор CFX96 («Bio-Rad», США). Инкубация образцов проводилась 3 минуты при температуре 70°C; по окончании цикла образцы помещали на лед. Смесь из 10 мкл пятикратного буфера для синтеза первой цепи, 5 мкл смеси dNTP (20 мМ), 5 мкл DTT (20 мМ) и 7,5 мкл MMLV ревертазы вносили по 27,5 мкл в каждую пробу. Образцы устанавливали в амплификатор и инкубировали в течение 1 часа при температуре 42°C, и 10 минут при 70°C. 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). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК; в качестве референсного гена использовали ген GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

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

производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации (<https://toptipbio.com/pfaffl-method-qpcr/>).

Метод относительного количественного анализа экспрессии мРНК генов основан на отношении экспрессий исследуемого гена к экспрессии референсного гена и является достаточным при исследовании физиологических изменений относительного уровня экспрессии мРНК генов. Для постановки ПЦР были использованы олигонуклеотидные праймеры (Beagle, Россия), представленные в **таблице 1**. Специфичность праймеров и зондов проверяли выравниванием на таргетные гены с использованием программы Primer BLAST.

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидных праймеров, использованных в исследовании

Название		Последовательность
		ь
GAPDH	F: 5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACA -3'	22
	R: 5'-ATGACAAGCTTCCCGTTCTC -3'	20
	FAM-5'- CAAATTCATGGCACCGTCAAGGC -3'- BHQ-1	24
ALPL	F: 5'-GGGAAATCTGTGGGCATTGT-3'	20
	R: 5'-GAGTACCAGTCCCGGTCAGC-3'	20
	5'- FAM- ACCACGAGAGTGAACCATGCCA-BHQ1-3'	22
BMP2	F: 5'-ACGAGGTCCTGAGCGAGTT-3'	19
	R: 5'-GACCTGAGTGCTGCGATAC-3'	20
	5'- FAM- CTGAAACAGAGACCCACCCCCAGCA- BHQ1-3'	25
BMP6	F: 5'- TTACAGGAGCATCAGCACAG-3'	20
	R: 5'- GGAGTCACAACCCACAGATT-3'	20
	5'- FAM- CCTCAGAAGAAGGCTGGCTGGAAT- BHQ1 -3'	24
RUNX2	F: 5'- CCAGAAGGCACAGACAGAAG-3'	20
	R: 5'- GATGAGGAATGCGCCCTAAA-3'	20
	5'- FAM- AGTTTGTCTCTGACCGCCTCAGT-BHQ1- 3'	24
CD49d	F: 5'-GТАCTTTGGAGCTTCTGTCTGT-3'	22
	R: 5'-TCTTCCTTCTCTGATGGT-3'	21
	5'- FAM - TGGACCTCAATGCAGATGGCTTCT-BHQ1- 3'	24

2.2.8. Количественное определение концентрации факторов роста, медиаторов с провоспалительной, хемокиновой активностью методом проточной флуориметрии

Определение количественного уровня биологически активных молекул (ростовых факторов/хемокинов/цитокинов) оценивали в супернатантах ММСК-ЖТ спустя 14 суток культивирования. Анализ проводили 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). Метод основан на способности антител на поверхности магнитных гранул (микросфер) связываться с исследуемыми биологическими молекулами. Интенсивность люминесценции антител пропорциональна количеству поглощённого света под воздействием лазера. Микросферы в комплексе с антителом и исследуемой биологической молекулой в камере анализатора Luminex подвергались воздействию двух лазеров с разной длиной волны. Флюорофоры испускали сигналы, регистрируемые системой датчиков прибора. В процессе анализа детектировался тип микросферы и наличие (концентрация) искомой биологической молекулы на соответствующем типе частиц.

Оценку концентрации исследуемых нами факторов (HGF - Hepatocyte Growth Factor, LIF - Leukemia inhibitory factor, M-CSF - Macrophage colony-stimulating factor, SCF - Stem cell factor, IL-3 - Interleukin-3, VEGF - Vascular endothelial growth factor, TNF- α - tumor necrosis factor alpha, IL-6 - Interleukin-6, TRAIL - Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10, SDF-1a - Stromal cell-derived factor-1, MCP-1 - Monocyte Chemoattractant Protein 1 и IL-8 - Interleukin-8) проводили в супернатантах 14-дневных клеточных культур ММСК-ЖТ, полученных центрифугированием при следующих условиях: 500 об/мин в течение 10 минут (при 4 °С). Затем образцы процессировали в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. На первом этапе добавляли по 0,05 мл раствора микросфер в специализированные 96-луночные планшеты BioPlex. Далее микросферы подвергались отмывке на промывочной станции Bio-PlexPro™ WashStations («Bio-Rad», США). После подготовки микросфер, в планшет вносили исследуемые стандартные образцы и раствор бланка в объеме 0,05 мл в соответствии с

протоколом производителя. Для эффективного связывания всех компонентов, инкубацию проводили в течение 30 минут в условиях полной темноты, при комнатной температуре и на термошейкере при 300 об/мин. Затем, к объему 3-х кратного буфера, используемого при отмывке, добавляли специфические антитела в объеме 25 мкл. По окончании второй инкубации образцы в планшете трижды отмывали и разбавляли в 0,1 мл стрептавидина-PE. Связывание стрептавидина с биотинилированными антителами в пробах длилось 10 минут в темноте и на термошейкере при 300 об/мин при комнатной температуре. После инкубации пробы трижды отмывали и разбавляли объемом 0,125 мл специального буфера. На последнем этапе планшеты с пробами на 30 секунд помещались в термошейкер при 1100 об/мин, после чего устанавливали в платформу Bio-Plex. Анализ данных проводили с помощью автоматического фотометра Bio-Plex (Bio-Plex® 200 Systems, «Bio-Rad», США) и программного обеспечения BioPlexManager («Bio-Rad», США). В соответствии с инструкцией производителя, концентрацию исследуемых молекул определяли по стандартной кривой набора (определяемый динамический диапазон составлял 2-32 000 пг/мл). Результаты выражались в пг/мл. Нижняя граница чувствительности прибора составляла <1 пг/мл. В связи с этим, по результатам анализа и статистической обработке количества содержания целевых веществ, значения ниже порога чувствительности метода приравнивали к 0 пг/мл.

2.2.9. Анализ дифференцировочного потенциала культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека методом цитологического дифференциального окрашивания и определение общей площади трехмерных островков/узелков минерализации

По истечении 21 дня культивирования исследуемые культуры дважды отмывали фосфатным буфером. Адгезированные клетки оставляли сушиться на воздухе, затем фиксировали в парах формалина и окрашивали 2% водным раствором ализаринового красного S (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции фирмы-производителя, для оценки минерализации межклеточного матрикса. Негативным контролем дифференцировки служила 2D культура ММСК-ЖТ в

стандартной ППС, не контактировавшая с трехмерным матриксом и гепарином в течение 21 дня.

Получение микрофотографий окрашенных культур осуществляли с использованием лабораторного биологического микроскопа для фазового контраста, флуоресценции и документирования IX 51 S8F в комплекте с программным обеспечением («Olympus Corporation», Филиппины) (**рисунок 7а**). Светочувствительность камеры на микроскопе не изменялась на протяжении всего периода эксперимента. Морфометрическое исследование площади окрашенных клеток проводили с использованием программного обеспечения Image-J Software (National Institutes of Health, США) согласно алгоритму, представленному в руководстве [Broeke J. et al., 2015].

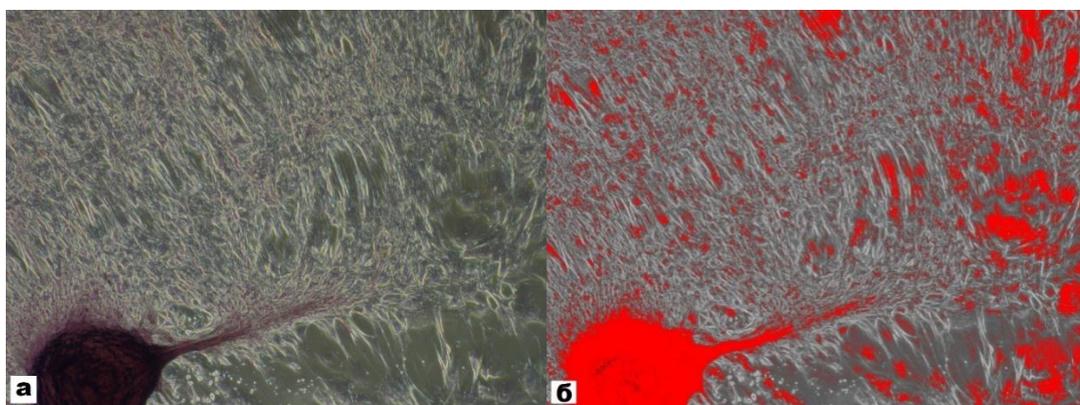


Рисунок 7. Микрофотографии окрашенных культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека спустя 21 день культивирования: а - исходное изображение, полученное с помощью лабораторного микроскопа для фазового контраста; б – изображения с выделенными очагами минерализации с использованием программного обеспечения Image-J Software

Очаги минерализации на микрофотографиях культур выделяли с использованием инструмента «Threshold». Для каждого центра минерализации индивидуально подбирался допуск инструмента на основании цветовой характеристики минерализата (**рисунок 7б**). После проведения измерений, площадь общей минерализации всех микрофотографий ($\text{мм}^2/\text{см}^2$) заносили в таблицу для проведения дальнейшего анализа.

2.2.10. Оценка влияния гидроксиапатита в присутствии/отсутствии гепарина на миграционные и пролиферативные способности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP

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 представляет собой систему из 2 полостей, разделенных пористой мембраной (диаметр пор 8 мкм), через которую осуществляется инвазия клеток.

ММСК-ЖТ помещали в верхнюю часть планшета объемом 180 мкл, в нижнюю часть объемом 150 мкл помещали нанозвесь ГАП (1 мг/мл). В верхние лунки добавляли ГР в экспериментальных группах с присутствием гепарина в соответствующем объеме с сохранением указанных физиологических доз (1 МЕ/мл). Нижняя поверхность мембраны покрыта ячейками из золотых электродов на 80%. Изменения импеданса, снятые с этих электродов, показывают площадь пористой мембраны с обратной стороны, занятую клетками в данный момент после инвазии через поры. Этот показатель визуализирует влияние наночастиц ГАП в присутствии/отсутствии гепарина на миграционную способность (инвазию) ММСК-ЖТ. Все работы выполняли в условиях стерильности в ламинарном потоке воздуха. Для исключения влияния температурного фактора, штатив для сборки планшета заранее помещали в CO₂ инкубатор на сутки.

В данном эксперименте использовали нанозвесь ГАП, так как объем нижней камеры СИМ-планшета слишком мал (168 мкл) для размещения полноразмерного ТiКФ-образца. Наночастицы ГАП в нижней камере находились в стандартной культуральной среде aMEM (100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина; 300 мг/л L-глутамина, Sigma-Aldrich, США). В верхней камере использовалась та же питательная среда, заранее прогретая в CO₂ инкубаторе. Для калибровки прибора использовали полную питательную среду объемом 50 мкл, к которой впоследствии добавляли взвесь ММСК-ЖТ в концентрации 3×10^4 клеток, включенную в объем 100 мкл среды. Контролем послужила группа исследования без добавления гепарина/ГАП. Планшет находился 10 мин в CO₂ инкубаторе, после

чего был установлен в прибор RTCA DP Analyzer. Показания импеданса снимали каждые 15 мин в течение 21 часа. Затем в лунки планшета добавляли ГР в соответствии с дизайном исследования. Планшет помещали на 10 мин в CO₂ инкубатор для прогрева, после чего снова устанавливали в прибор RTCA DP Analyzer. Показания импеданса детектировали каждые 15 мин в течение 72 часов. Каждая экспериментальная группа была представлена в 4х повторях (n=4).

16-луночный E-планшет представляет собой систему, обеспечивающую непрерывное количественное считывание скорости пролиферации клеток, их количества, размера/формы и качества прикрепления к субстрату. Объем лунок составляет 200 мкл. На дне каждой лунки размещен набор золотых электродов, вплавленных в нижнюю поверхность микропланшета. За счет электродов и взаимодействующих с ними на дне лунки клеток происходит анализ клеточного импеданса (индекса). Величина этого импеданса зависит от количества клеток, размера и формы клеток, а также качества прикрепления клеток к субстрату.

В каждую лунку добавляли 50 мкл полной питательной среды на основе aMEM (100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина; 300 мг/л L-глутамина, Sigma-Aldrich, США). Помещали планшеты в CO₂ инкубатор на 10 минут, затем ставили на 1ый шаг в прибор RTCA DP Analyzer – 1 цикл 15 секунд. Добавляли 50 мкл ППС и нановзвеси ГАП (1 мг/мл) в соответствии с дизайном эксперимента. Помещали планшеты в CO₂ инкубатор на 10 минут. Снова ставили в прибор на новый шаг – 1 цикл 15 секунд. На последнем этапе добавляли 100 мкл клеточной взвеси (30000 клеток). Помещали планшеты в CO₂ инкубатор на 10 минут, затем в прибор на 21 час (85 циклов по 15 минут). Спустя 21 час добавили соответствующий дизайну эксперимента объем ГР в соответствующие лунки. Планшеты помещали в CO₂ инкубатор на 5 минут. Далее планшеты помещали в прибор на 72 часа (288 циклов по 15 минут) для проведения анализа и подсчета клеточного индекса (КИ). КИ представляет собой необработанные выходные данные прибора и является мерой общего импеданса в каждой лунке.

2.2.11. Статистический анализ данных

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. Выборки не подчинялись закону нормального распределения, в связи с чем для каждой выборки вычисляли критерии описательной статистики: медиана, первый и третий квартиль (Q1(25%), Q3(75%)). 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) и коэффициента регрессии (r). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [Кремер Н., 2007].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Оценка жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани в присутствии/отсутствии гепарина

При проведении анализа действия разных концентраций гепарина на спектр изучаемых нами параметров ММСК-ЖТ, значительные изменения, при условии сохранения высокой жизнеспособности клеточной культуры, были выявлены только при действии гепарина в концентрации 1 МЕ/мл (8 мкг/мл), которая и была в дальнейшем использована в настоящем *in vitro* исследовании. Оценка жизнеспособности клеточных культур была произведена спустя 14 суток культивирования во всех группах исследования (табл. 2).

Таблица 2. Относительное (%) содержание живых и мертвых форм мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* (срок культивирования - 14 дней), Ме (Q₁ - Q₃)

Группы исследования		Количество живых клеток, %	Количество апоптотических клеток, %	Количество мертвых клеток, %
2D модель n = 6	1	94,93 (93,76 - 95,07)	3,17 (3,01 - 4,95)	1,81 (1,29 - 1,96)
2D модель_гепарин n = 6	2	92,69 (92,13 - 94,29)	5,53 (4,65 - 5,85)	1,79 (1,07 - 2,03)
3D модель n = 6	3	93,89 (93,26 - 94,08)	4,54 (4,38 - 5,09)	1,55 (1,52 - 1,73)
3D модель_гепарин n = 9	4	93,45 (93,14 - 93,52)	5,39 (3,21 - 5,44)	1,32 (1,10 - 1,47)

Примечание: здесь и в таблицах: **3-8.**

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

Количество живых клеток в 2D модели (контрольная группа) составило 94,93 (93,76-95,07)%; доля апоптотических форм и мертвых клеток - 3,17 (3,01-4,95)% и 1,81 (1,29-1,96)% соответственно. Статистический анализ полученных данных не выявил достоверных различий между исследуемыми группами. Все исследуемые параметры (количество живых, апоптотических и мертвых клеток) были сопоставимы со значениями контрольной группы (2D модель) (табл. 2).

3.2 Оценка фенотипических параметров мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани в присутствии/отсутствии гепарина.

По истечении срока культивирования (14 суток) доля клеток, экспрессирующих маркеры кроветворных клеток [CD45,34,14,20]⁺ в 2D модели составила 0,41 (0,17 - 0,52)% (табл. 3). Достоверное увеличение числа клеток с фенотипом гемопоэтических (относительно всех групп исследования) наблюдалось при добавлении имплантата в среду культивирования и составило 2,42 (1,98 - 2,85)% ($p < 0,05$). Совместное сокультивирование клеток с гепарином и имплантатом также способствовало повышению числа [CD45,34,14,20]⁺ клеток относительно аналогичных значений в 2D модели и 2D модели с гепарином ($p < 0,05$).

Во всех клеточных моделях регистрировалось достоверное уменьшение доли клеток, экспрессирующих на своей поверхности маркеры ММСК CD90, CD105 и CD73, относительно значений 2D контроля ($p < 0,05$). Наибольшие изменения изучаемых параметров регистрировались в 3D модели с гепарином ($p < 0,05$) (табл. 3).

Таблица 3. Анализ фенотипического состава культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина, Me (Q1 - Q3) (срок культивирования - 14 дней)

Группы исследования / Показатели (%)		[CD90] ⁺	[CD105] ⁺	[CD73] ⁺	[CD45,34,14,20] ⁺
2D модель n = 6	1	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	2	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	3	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<0,05 p1<0,05	2,42 (1,98 - 2,85) p0<0,05 p1<0,05
3D модель_гепарин n = 9	4	71,07 (70,36 - 73,25) p0<0,05 p1<0,05 p2<0,05	71,64 (70,18 - 72,08) p0<0,05 p1<0,05 p2<0,05	63,63 (62,87 - 63,73) p0<0,05 p1<0,05 p2<0,05	1,24 (0,82 - 1,74) p0<0,05 p1<0,05 p2<0,05

3.3 Оценка относительной экспрессии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека мРНК генов остеодифференцировки и клеточной адгезии в *in vitro* условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани в присутствии/отсутствии гепарина

По истечении 14 суток культивирования было выявлено, что добавление в среду культивирования ММСК-ЖТ имплантатов и гепарина способствовало достоверному увеличению уровня относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *BMP2* и *BMP6*) и гена α -субъединицы интегрина VLA-4 (*CD49d*) (табл. 4).

Таблица 4. Уровни относительной экспрессии генов в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 14 суток), Me (Q1 - Q3)

Определяемый 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) p0<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) p0<0,05	1,67 (1,55 – 3,21) p0<0,05 p1<0,05	1,92 (1,45 – 2,86) p0<0,05 p1<0,05
<i>BMP6</i>	0,37 (0,26 – 0,64)	2,08 (0,98 – 3,59) p0<0,05	0,44 (0,29 – 0,64) p0<0,05 p1<0,05	1,25 (1,11 – 1,58) p0<0,05 p2<0,05
<i>ALPL</i>	0,37 (0,26 – 0,66)	6,23 (5,29 – 8,51) p0<0,05	1,78 (1,42 – 2,51) p0<0,05 p1<0,05	2,75 (2,37 – 4,87) p0<0,05 p1<0,05 p2<0,05
<i>CD49d</i>	0,43 (0,29 – 0,46)	4,89 (3,29 – 6,86) p0<0,05	1,96 (1,87 – 3,55) p0<0,05 p1<0,05	1,72 (1,68 – 3,76) p0<0,05 p1<0,05

Оценка уровня относительной экспрессии мРНК гена *RUNX2* выявила статистически значимое увеличение экспрессии данного гена в модели культивирования с гепарином (2D модель_гепарин) относительно контрольной группы (2D модель, p<0,05) (табл. 4, рис. 8). Значимых различий в экспрессии мРНК гена *RUNX2* в группе исследования 3D модель_гепарин обнаружено не было.

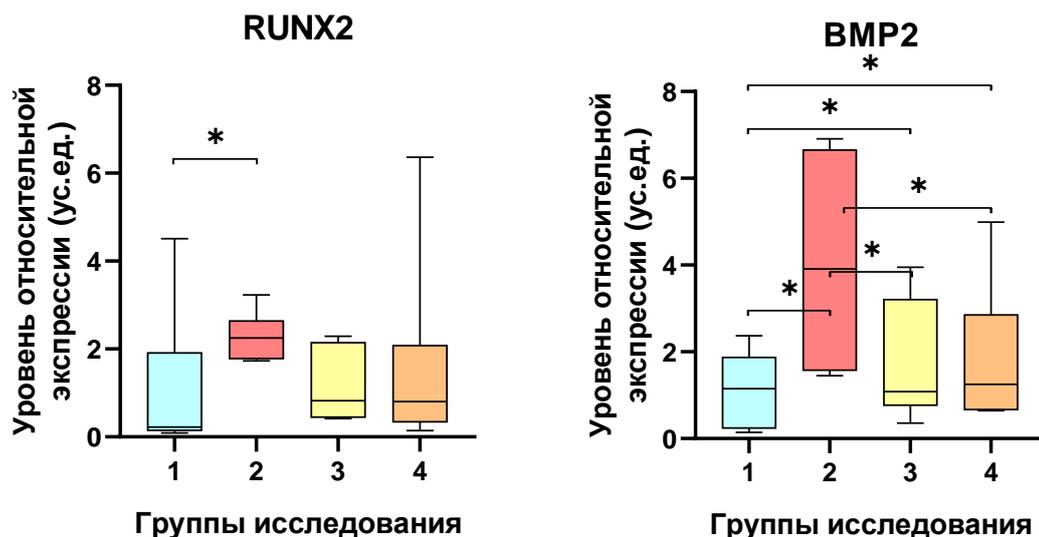


Рисунок 8. Изменение уровня относительной экспрессии (усл. ед.) мРНК генов *RUNX2* и *BMP2* в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в условиях сокультивирования *in vitro* с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм) в присутствии/отсутствии гепарина, срок культивирования - 14 суток. Примечание: здесь и в рисунках **9,10**. 1 – 2D модель, 2 - 2D модель_гепарин, 3 - 3D модель, 4 - 3D модель_гепарин.

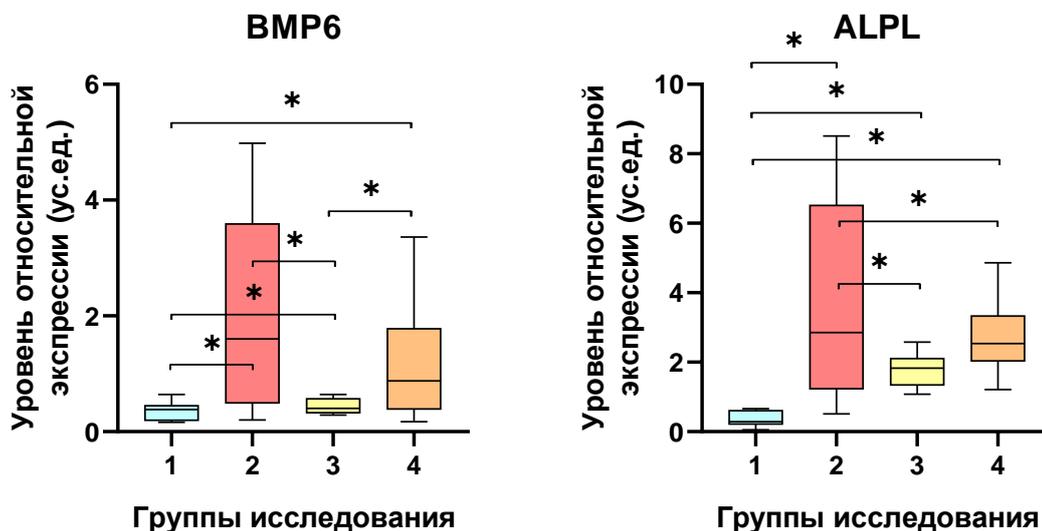


Рисунок 9. Изменение уровня относительной экспрессии (усл. ед.) мРНК генов *BMP6* и *ALPL* в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в условиях сокультивирования *in vitro* с трехмерным

матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм) в присутствии/отсутствии гепарина, срок культивирования - 14 суток

В группе 2D модель_гепарин регистрировался достоверный рост относительного уровня экспрессии мРНК гена *BMP2* относительно всех экспериментальных групп ($p<0,05$) (табл. 4, рис. 8). В группах 3D модель и 3D модель_гепарин уровень экспрессии мРНК гена *BMP2* превышал аналогичные значения 2D контрольной группы ($p<0,05$).

Аналогичные результаты были получены при анализе уровня относительной экспрессии мРНК гена *BMP6* (табл. 4, рис. 9). Так, в группе 2D модель_гепарин экспрессия данного гена была выше относительно 2D и 3D моделей ($p<0,05$). Уровень экспрессии мРНК гена *BMP6* также повышался в группах 3D модель и 3D модель_гепарин в сравнении с 2D моделью ($p<0,05$). В 3D модели с гепарином уровень экспрессии мРНК гена *BMP6* был выше, чем в 3D модели ($p<0,05$).

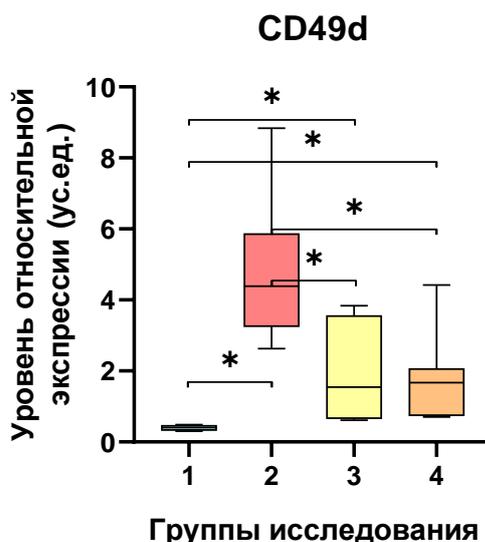


Рисунок 10. Изменение уровня относительной экспрессии (усл. ед.) мРНК гена *CD49d* в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в условиях сокультивирования *in vitro* с трехмерным матриксом с кальцийфосфатным покрытием ($Ra=2,0-3,0$ мкм) в присутствии/отсутствии гепарина, срок культивирования - 14 суток

Нами получено статистически значимое повышение экспрессии мРНК гена *ALPL* в группе 2D модель_гепарин относительно всех исследуемых групп ($p<0,05$)

(табл. 4, рис. 9). Достоверное повышение экспрессии этого гена регистрировалось также в группах 3D модель и 3D модель_гепарин относительно 2D модели ($p < 0,05$).

Уровень экспрессии мРНК гена *CD49d* в группе 2D модель_гепарин превышал аналогичные значения всех групп исследования ($p < 0,05$) (табл. 4, рис. 10). В 3D модели и 3D модели с гепарином также регистрировалось достоверное увеличение уровня экспрессии мРНК гена *CD49d* относительно 2D модели ($p < 0,05$).

3.4 Оценка секреции факторов роста, хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека после сокультивирования с ТiКФ образцами в присутствии/отсутствии гепарина

Результаты комплексного мультиплексного анализа представлены в таблице 5. В соответствии с полученными данными, ММСК-ЖТ в 2D модели продуцировали не менее 40 факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов на 14 сутки культивирования. Для более детального анализа из всего спектра продуцируемых цитокинов нами были выбраны факторы роста (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, VEGF), хемокины (SDF-1a, MCP-1, IL-8) и медиаторы с провоспалительной активностью (TNF- α , TRAIL, IL-6).

Таблица 5. Концентрация (пг/мл) ростовых факторов (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, VEGF), медиаторов с провоспалительной (TNF- α , TRAIL, IL-6) и хемоаттрактантной (SDF-1a, MCP-1, IL-8) активностью, определяемых в супернатантах культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования - 14 дней), Me (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	8,59	24,04	126,1

	(32,63 - 38,6)	(6,37 - 10,81) p0<0,05	(16,39 - 30,69) p0<0,05 p1<0,05	(115,37 - 236,9) p0<0,05 p1<0,05 p2<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<0,05 p1<0,05	17,74 (16,88 - 18,77) p0<0,05 p1<0,05 p2<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<0,05 p1<0,05	4,84 (3,90 - 5,91) p1<0,05 p2<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<0,05 p1<0,05	5,96 (3,15 - 7,89) p1<0,05 p2<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<0,05 p1<0,05	1,61 (1,58 - 1,63) p0<0,05 p1<0,05 p2<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<0,05 p1<0,05	475,10 (452,31 - 482,11) p0<0,05 p1<0,05 p2<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<0,05 p1<0,05	2,33 (2,02 - 2,63) p1<0,05 p2<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<0,05 p1<0,05	283,14 (276,13 - 293,23) p0<0,05 p1<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<0,05 p1<0,05	24,32 (20,23 - 26,10) p0<0,05 p1<0,05 p2<0,05
Хемокины				
SDF-1a	105,9 (103,8 - 118,1)	5,34 (3,28 - 6,40) p0<0,05	29,26 (28,78 - 29,74) p0<0,05	145,91 (142,12 - 149,81) p0<0,05

			p1<0,05	p1<0,05 p2<0,05
МСП-1	198,98 (182,13 – 201,11)	23,82 (19,12 – 26,21) p0<0,05	107,43 (101,01 – 114,23) p0<0,05 p1<0,05	103,12 (95,14 – 108,29) p0<0,05 p1<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<0,05 p1<0,05	86,32 (68,45 – 180,21) p1<0,05 p2<0,05

Согласно полученным данным, продукция ростового фактора HGF культурой ММСК-ЖТ в группе 2D модель_гепарин статистически значимо снижалась относительно контрольной группы (p<0,05) (**табл. 5**). Стоит отметить, что при сокультивировании с имплантатом (3D модель) происходило значимое снижение уровня HGF относительно 2D-контроля, однако концентрации HGF в этой группе была значительно выше, чем в модели исследования 2D модель_гепарин (p<0,05). Интересно, что в группе 3D модель_гепарин продукция HGF была статистически значимо выше по сравнению со всеми группами исследования (p<0,05).

Добавление гепарина в 2D-культуру приводило к снижению уровня ростового фактора LIF относительно 2D-контрольной группы (p<0,05) (**табл. 5**). Сокультивирование с имплантатом (3D модель) способствовало снижению концентрации изучаемого фактора относительно 2D модели, однако содержание LIF в этой группе было значимо выше, чем в группе 2D модель_гепарин (p<0,05). Следует отметить, что уровень LIF в супернатантах 3D модели с гепарином статистически значимо снижался относительно 2D-контроля, но был значимо выше, чем в группах исследования 2D модель_гепарин и 3D модель (p<0,05).

Уровень ростового фактора М-CSF значимо снижался в группе 2D модель_гепарин в сравнении с 2D моделью (p<0,05) (**табл. 5**). Важно отметить, что в 3D модели без гепарина продукция М-CSF значимо повышалась относительно всех групп исследования (p<0,05). Содержание М-CSF в группе 3D модель_гепарин

было достоверно выше в сравнении со значениями, полученными в группе 2D модель_гепарин ($p < 0,05$).

Аналогичные результаты были получены при анализе уровней ростового фактора SCF: значимое снижение в группе 2D модель_гепарин (относительно 2D модели); повышение содержания SCF в 3D модели (относительно всех исследуемых групп) ($p < 0,05$) (табл. 5). Стоит добавить, что концентрация данного ростового фактора в группе 3D модель_гепарин была статистически значимо выше относительно 2D модели с гепарином ($p < 0,05$).

В 2D модели с гепарином регистрировалось уменьшение концентрации IL-3 по сравнению с 2D-контролем ($p < 0,05$) (табл. 5). В 3D модели регистрировался достоверный рост продукции IL-3 культурой ММСК-ЖТ относительно 2D-контроля и 2D модели с гепарином ($p < 0,05$). Наибольшая концентрация IL-3 (относительно других групп) была задетектирована в супернатантах группы 3D модель_гепарин ($p < 0,05$).

В 2D модели с гепарином было задетектировано повышение концентрации VEGF в сравнении с 2D-контрольной группой ($p < 0,05$) (табл. 5). Стоит отметить, что в 3D модели концентрация VEGF в супернатантах клеточных культур была выше относительно групп 2D-контроля и 2D модель_гепарин ($p < 0,05$). Самые высокие цифры данного ростового фактора (относительно других групп) были зарегистрированы в 3D модели с гепарином ($p < 0,05$).

Содержание провоспалительного фактора TNF- α в 2D модели с гепарином было ниже в сравнении с 2D-контролем ($p < 0,05$) (табл. 5). Уровень изучаемого фактора в 3D-модели был выше относительно значений, полученных в 2D модели и 2D модели с гепарином ($p < 0,05$). Концентрация TNF- α в 3D модели с гепарином оказалась выше, чем в 2D модели с гепарином, но была ниже значений 3D модели ($p < 0,05$).

В 2D модели с гепарином концентрация провоспалительного цитокина IL-6 превышала уровень значений в 2D модели ($p < 0,05$) (табл. 5). Следует отметить, что продукция IL-6 культурой ММСК-ЖТ в 3D моделях (в присутствии/отсутствии гепарина) достоверно повышалась относительно 2D-контроля и 2D модели с гепарином ($p < 0,05$).

Концентрация провоспалительного/проапоптотического фактора TRAIL снижалась в 2D модели с гепарином относительно 2D контроля ($p < 0,05$) (табл. 5). Аналогичное снижение продукции TRAIL культурами ММСК-ЖТ было зафиксировано в 3D модели (в сравнении с 2D-контролем, $p < 0,05$). Интересно отметить, что секреция фактора TRAIL культурой ММСК-ЖТ в группе 3D модель_гепарин была значимо выше значений остальных экспериментальных групп ($p < 0,05$).

Сокультивирование ММСК-ЖТ с гепарином (2D модель_гепарин) приводило к статистически значимому уменьшению продукции хемокинового фактора SDF-1a относительно 2D модели ($p < 0,05$) (табл. 5). В 3D модели секреция фактора SDF-1a культурой ММСК-ЖТ значимо возрастала в сравнении с 2D моделью с гепарином, но была ниже относительно 2D-контроля ($p < 0,05$). Важно сказать, что в группе 3D модель_гепарин концентрации SDF-1a была достоверно выше относительно всех экспериментальных групп ($p < 0,05$).

В экспериментальных группах 2D модель_гепарин и 3D модель (с гепарином и без него) регистрировалось значимое снижение содержания хемокинового фактора MCP-1 в сравнении с 2D моделью ($p < 0,05$) (табл. 5). Однако концентрация MCP-1 в 3D модели (в присутствии/отсутствии гепарина) была значимо выше значений, полученных в 2D модели с гепарином ($p < 0,05$).

Аналогичным образом уменьшалась (относительно всех групп) продукция культурой ММСК-ЖТ цитокина IL-8 в группе 2D модель_гепарин ($p < 0,05$) (табл. 5). Стоит отметить, что содержание хемокина в культурах ММСК-ЖТ в 3D модели с гепарином было достоверно повышено относительно 3D модели ($p < 0,05$).

3.5 Оценка *in vitro* минерализации культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в условиях сокультивирования с матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани в присутствии/отсутствии гепарина

Для выявления способности культур ММСК-ЖТ к остеоинтеграции в разных условиях культивирования *in vitro*, на 21 сутки культивирования была проведена цифровая съемка клеточных культур на инвертированном микроскопе, после фиксации культуры формалином и предварительного окрашивания ализариновым красным.

Нами было выявлено, что в моделях сокультивирования ММСК-ЖТ с гепарином и трехмерным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани (3D модель_гепарин), значительно увеличивалась интенсивность окраски и количество локусов окрашивания ализариновым красным (рис. 11г), что описывает процесс минерализации межклеточного вещества. Межклеточное вещество в 2D моделях (в присутствии/отсутствии гепарина) на пластике (рис. 11а, в) окрашивалось менее интенсивно. При этом в моделях сокультивирования в присутствии гепарина (как с TiKФ-образцами, так и без них), плотность распределения клеток на пластиковой поверхности лунок планшетов была значительно меньше (рис. 11в, г), чем в культурах без гепарина (рис. 11а, б).

Анализ результатов, полученных по истечении 21-суточного культивирования методом цитологического окрашивания, показал достоверное увеличение (в сравнении с 2D моделью) площади минерализации межклеточного вещества в группе 2D модель_гепарин ($p < 0,05$) (табл. 6). Также было выявлено значимое увеличение суммарной площади минерализованной области на пластике вблизи образцов при дистантном сокультивировании ММСК-ЖТ с имплантатами (3D модель) в сравнении с группами 2D модель и 2D модель_гепарин ($p < 0,05$). Интересно, что наибольший показатель, отражающий суммарную площадь участков минерализации (относительно всех групп), был зафиксирован в группе 3D модель_гепарин ($p < 0,05$).

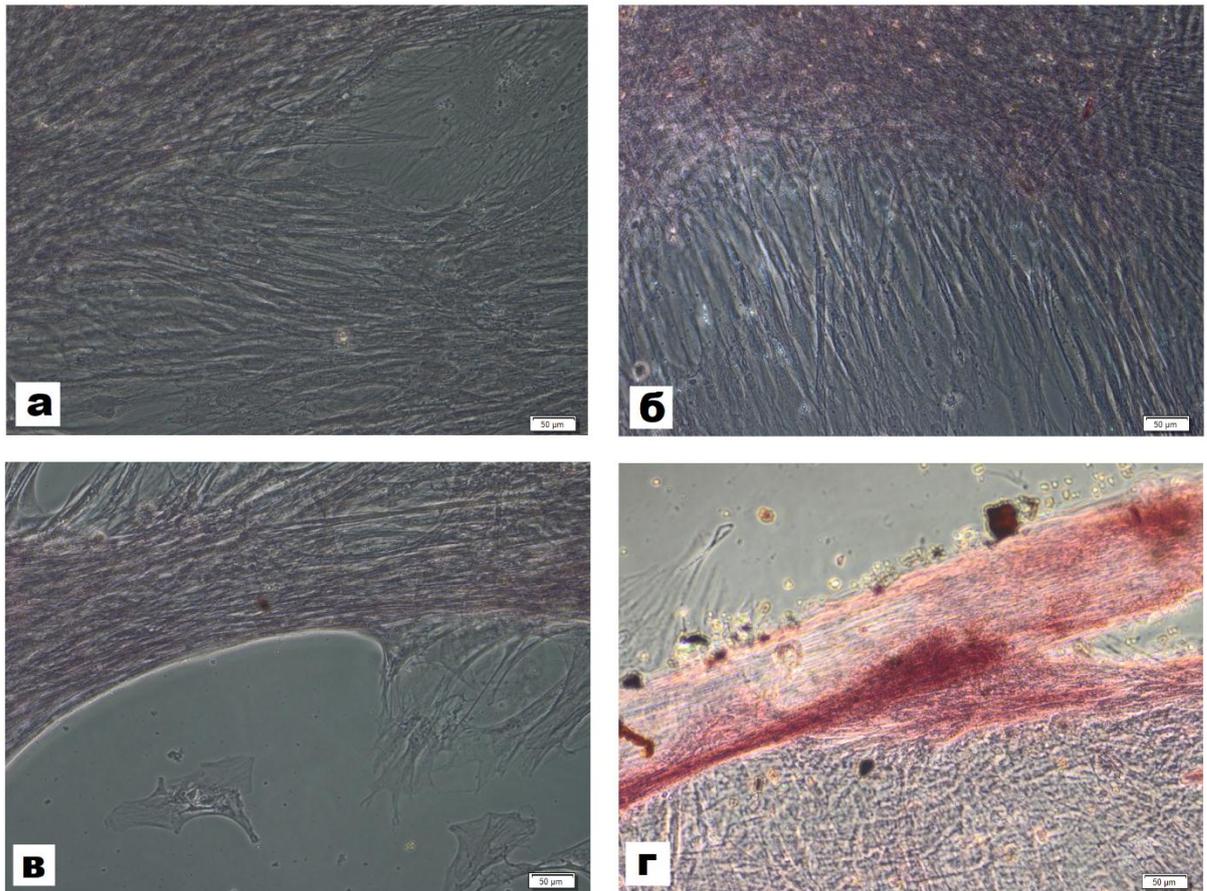


Рисунок 11. Морфологическое состояние 21-суточной культуры мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека в стандартной среде DMEM/F12 после сравнительного цитологического окрашивания ализариновым красным участков минерализации межклеточного вещества: (а) 2D модель, (б) 3D модель, (в) 2D модель_гепарин, (г) 3D модель_гепарин. Линейка в углу снимков соответствует 50 мкм

Таким образом, в условиях трехмерного моделирования регенерации костной ткани *in vitro* (сокультивирование с ТiКФ образцами, имитирующими минеральное вещество регенерирующей костной ткани, в присутствии/отсутствии гепарина), усиление минерализации межклеточного вещества может свидетельствовать о дифференцировке ММСК-ЖТ в секретирующие остеобласты.

Таблица 6. Суммарная площадь островков/узелков минерализации (при окраске ализариновым красным) в культурах мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека в различных условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 21 день), Me (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<0,05 p1<0,05
3D модель_гепарин n = 9 n1 = 150	4	3,72 (3,55 – 4,15) p0<0,05 p1<0,05 p2<0,05

Примечание: n1 - число снимков

3.6 Оценка миграционной и пролиферативной активностей мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека через микропоры с использованием электродной системы xCELLigence® RTCA DP

Результаты миграционной активности ММСК-ЖТ в присутствии гепарина и/или взвеси наночастиц ГАП представлены на **рисунке 12** и в **таблице 7**. График миграции представляет собой логарифмическую кривую, описывающую динамику миграции ММСК-ЖТ через пористую мембрану планшета CIM-plate, имитирующую стенки кровеносных капилляров с высокой аппроксимацией (R² = 0,93). Кривые, отражающие динамику миграции (инвазии) клеток через пористую мембрану, построены с помощью системы xCELLigence и визуально могут быть разбиты на 2 участка: Фаза 1 – (0-8 часов) фаза линейного роста; Фаза 2 – (8-92 часов) фаза логарифмического роста с постепенным насыщением показателей

индекса клеточной миграции. Среднее время выхода логарифмической кривой на плато составило 8 часов (до добавления гепарина). Мы предположили связь первой фазы индекса клеточной миграции (ИКМ) с инвазией ММСК-ЖТ из верхней камеры в нижнюю через микропоры полимерной мембраны, что имитирует миграцию подвижных клеток из кровеносного русла в ткани. Вторая фаза может быть обусловлена распластыванием ММСК-ЖТ на поверхности электродов.

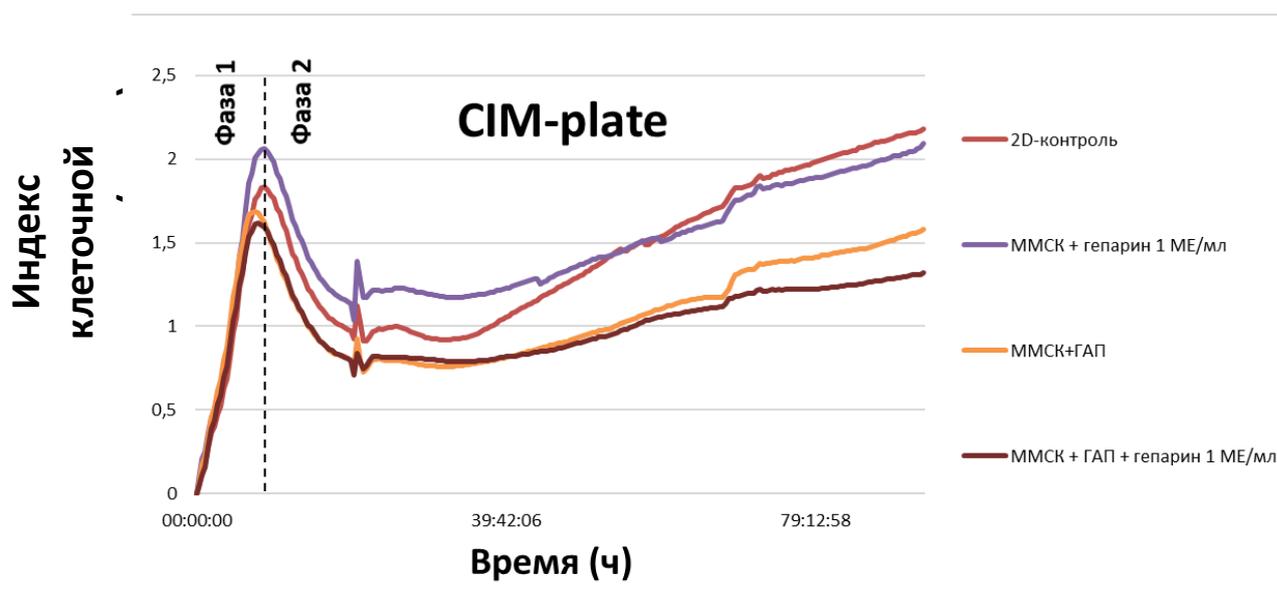


Рисунок 12. Кривые инвазии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека во всех группах исследования в электродной системе RTCA (92-ч мониторинг). Фаза 1 - фаза линейного роста; Фаза 2 - фаза логарифмического роста ИКМ

Данные на **рисунке 12** демонстрируют первоначальное резкое увеличение ИКМ во всех группах исследования из-за быстрой инвазивной миграции клеток в течение первых 8 часов. Спустя 8 часов от начала эксперимента, клеточность в нижней камере входила в фазу логарифмического роста, связанную с замедлением скорости прироста ИКМ. После добавления гепарина в лунки планшета (спустя 22 часа от начала эксперимента), ИКМ резко увеличивался в первый час во всех группах исследования, кроме модели культивирования с 1 МЕ/мл гепарина и ГАП. Затем наблюдалось снижение миграционной активности ММСК-ЖТ во всех исследуемых группах, переходящее в фазу логарифмического роста ИКМ через 30 часов от начала эксперимента.

Моделирование капиллярного хемотаксиса ММСК-ЖТ в зону регенерации костной ткани позволило получить интересные результаты по истечении 60 часов от начала эксперимента (**рис. 12**). Присутствие наночастиц ГАП (1 мг/мл) в среде культивирования без прямого контакта с ММСК-ЖТ достоверно (в 2,3 раза, $p < 0,05$) снижало скорость клеточной инвазии из верхней камеры в нижнюю лунку системы RTCA в модели с гепарином относительно контрольной группы без ГАП и гепарина ($p < 0,05$). Стоит добавить, что ИКМ в этой же модели исследования (ММСК-ЖТ+ГАП+гепарин) был достоверно ниже относительно модели ММСК-ЖТ+гепарин ($p < 0,05$).

По истечении 92 часов культивирования в клеточной модели ММСК-ЖТ+гепарин происходило достоверное снижение ИКМ относительно 2D-контрольной группы ($p < 0,05$) (**рис. 12, табл.7**).

Таблица 7. Изменение индекса клеточной миграции (ИКМ, усл. ед.) мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека через микропористую мембрану в присутствии нановзвеси гидроксиапатита в условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 92 ч), Me ($Q_1 - Q_3$)

Группы исследования		Индекс клеточной миграции, усл. ед.
2D контроль n = 6	1	2,16 (1,54 - 2,95)
ММСК-ЖТ+гепарин n = 6	2	1,76 (1,64 – 1,79) $p_0 < 0,05$
ММСК-ЖТ+ГАП n = 6	3	1,84 (1,62 – 2,29) $p_0 < 0,05$
ММСК-ЖТ+ГАП+гепарин n = 9	4	0,92 (0,55 – 1,34) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание: здесь и в таблице: **8.**
 $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с 1 группой (**2D контроль**);
 $p_1 < 0,05$ – достоверные различия со 2 группой (**ММСК-ЖТ+гепарин**);
 $p_2 < 0,05$ – достоверные различия с 3 группой (**ММСК-ЖТ+ГАП**);
n – число наблюдений (образцов) в каждой группе исследования

n1 - число снимков

При добавлении наночастиц ГАП в модели ММСК-ЖТ+ГАП также зафиксировано статистически значимое снижение ИКМ в сравнении в контрольной группой ($p < 0,05$). В модели исследования ММСК-ЖТ+ГАП+гепарин наблюдался самый низкий уровень ИКМ, значимо отличающийся от всех групп исследования ($p < 0,05$). Таким образом, наночастицы синтетического ГАП, без прямого контакта с ММСК жировой ткани человека, в присутствии гепарина, обладали способностью влиять на подвижность исследуемых клеток.

Результаты пролиферативной активности ММСК-ЖТ в присутствии гепарина и/или взвеси наночастиц ГАП представлены на **рисунке 13** и в **таблице 8**. График представляет собой логарифмическую кривую, описывающую динамику индекса клеточной пролиферации (ИКП) ММСК-ЖТ, величина которого зависит от количества клеток, размера и формы клеток, а также качества прикрепления клеток к субстрату 16-луночного E-планшета. Кривые, отражающие динамику клеточного индекса, построены с помощью системы xCELLigence и визуально могут быть разбиты на 2 участка: Фаза 1 – (0-8 часов) фаза линейного роста; Фаза 2 – (8-92 часов) фаза логарифмического роста с постепенным насыщением показателей клеточного индекса.

Приведенные данные демонстрировали максимальные показатели клеточного индекса во всех исследуемых культурах, преимущественно, на 3й час от начала эксперимента, что свидетельствует об успешной адгезии клеток к электродной системе планшета E-plate (**рис. 13**). Далее, до момента добавления гепарина (22 часа), отмечалось резкое снижение числа пролиферирующих клеток во всех экспериментальных группах и клетки входили в фазу логарифмического роста.

По истечении 22 часов культивирования, в соответствии с дизайном исследования, в лунки был добавлен гепарин в концентрации 1 МЕ/мл. Пролиферативная активность клеток в моделях, культивируемых с наночастицами синтетического ГАП в прямом контакте, через 25 часов от начала эксперимента, статистически значимо оказалась ниже относительно значений в моделях 2D-контроль и ММСК-ЖТ+гепарин ($p < 0,05$) (**рис. 13**). В группе исследования ММСК-

ЖТ+ГАП+гепарин также снижался ИКП относительно контрольной группы и модели ММСК-ЖТ+гепарин ($p < 0,05$). Таким образом, снижение пролиферативной активности в обозначенных группах, вероятно, обусловлено добавлением наночастиц ГАП.

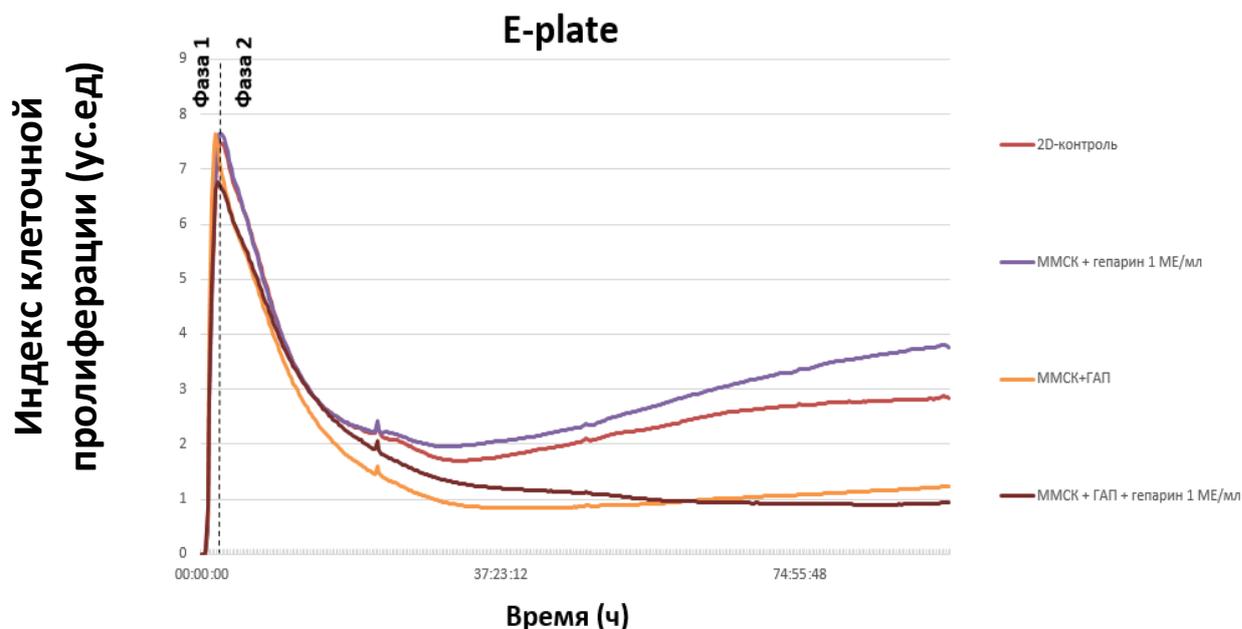


Рисунок 13. Кривые клеточной пролиферации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека во всех группах исследования в электродной системе RTCA (92-ч мониторинг). Фаза 1 - фаза линейного роста; Фаза 2 - фаза логарифмического роста ИКП

По истечении 60 часов культивирования, ИКП в модели в присутствии ГАП оказался значимо ниже в сравнении моделью ММСК-ЖТ+гепарин ($p < 0,05$) (**рис. 13**). Аналогичным образом происходило значимое снижение ИКП в модели ММСК-ЖТ+ГАП+гепарин относительно модели ММСК-ЖТ+гепарин ($p < 0,05$).

На момент окончания эксперимента (по истечении 92 часов), нами были зарегистрированы стабильные уровни ИКП во всех группах исследования (**рис. 13, табл. 8**). На графике кривых пролиферации ММСК-ЖТ в модели ММСК-ЖТ+гепарин происходило значимое увеличение ИКП относительно контрольной группы к концу эксперимента ($p < 0,05$). Добавление нановзвеси ГАП в модели ММСК-ЖТ+ГАП статистически достоверно снижало индекс клеточной

пролиферации в сравнении с контрольной группой и моделью ММСК-ЖТ+гепарин ($p < 0,05$). В модели ММСК-ЖТ+ГАП+гепарин отмечен низкий уровень ИКП на момент окончания эксперимента, статистически значимо отличающийся от 2D контроля и модели ММСК-ЖТ+гепарин ($p < 0,05$). Исходя из полученных данных, добавление нановзвеси ГАП в культуру ММСК-ЖТ человека оказывало негативное влияние на их способность к распластыванию.

Таблица 8. Изменение индекса клеточной пролиферации (ИКП, усл. ед.) мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в присутствии нановзвеси гидроксиапатита в условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 92 ч), Me ($Q_1 - Q_3$)

Группы исследования		Индекс клеточной пролиферации, усл. ед.
2D контроль n = 6	1	2,85 (2,67 – 3,02)
ММСК-ЖТ+гепарин n = 6	2	3,95 (3,92 – 3,98) $p_0 < 0,05$
ММСК-ЖТ+ГАП n = 6	3	1,12 (0,82 – 1,35) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$
ММСК-ЖТ+ГАП+гепарин n = 9	4	1,22 (0,93 – 1,34) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$

Данные по корреляционным взаимосвязям, отражающим связь исследуемых параметров в разных моделях культивирования, приведены в виде корреляционных матриц (рисунки 14-16).

3D модель

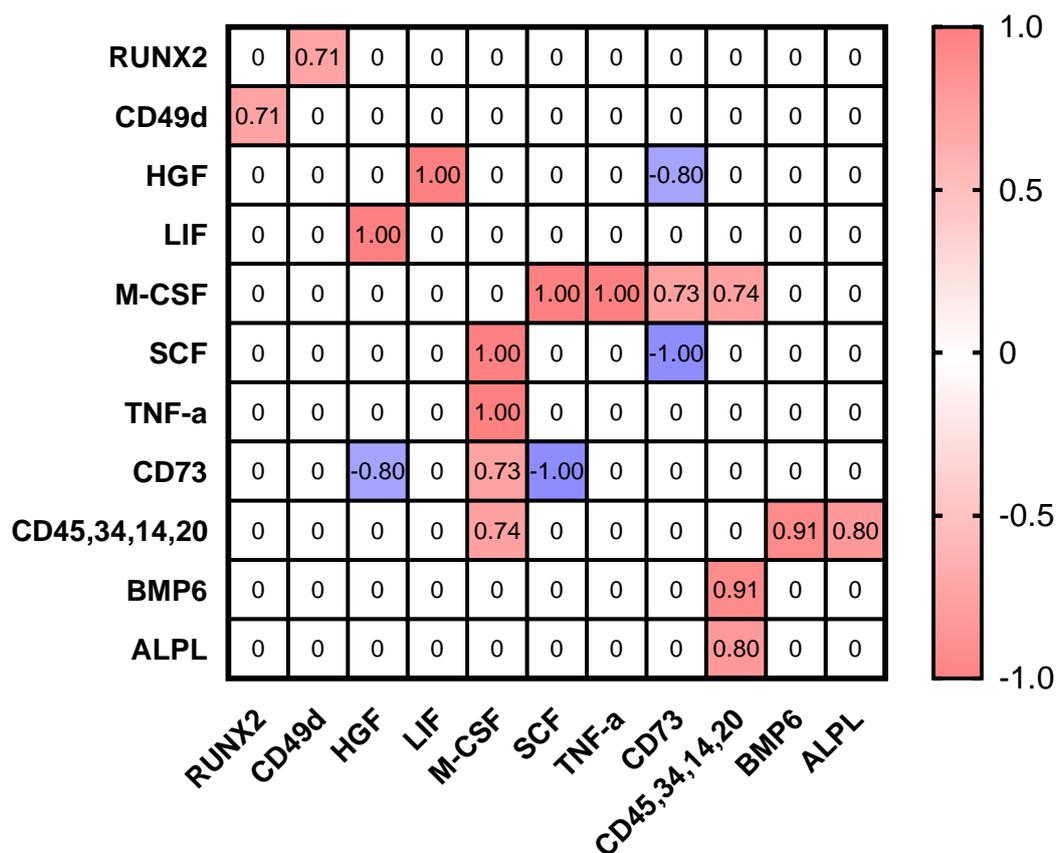


Рисунок 14. Корреляционная матрица, отражающая взаимосвязь исследуемых параметров в 3D модели. Цветом отмечены значимые различия при $p < 0.05$. Значение в ячейках (r) характеризуют силу взаимосвязи

2D модель_гепарин

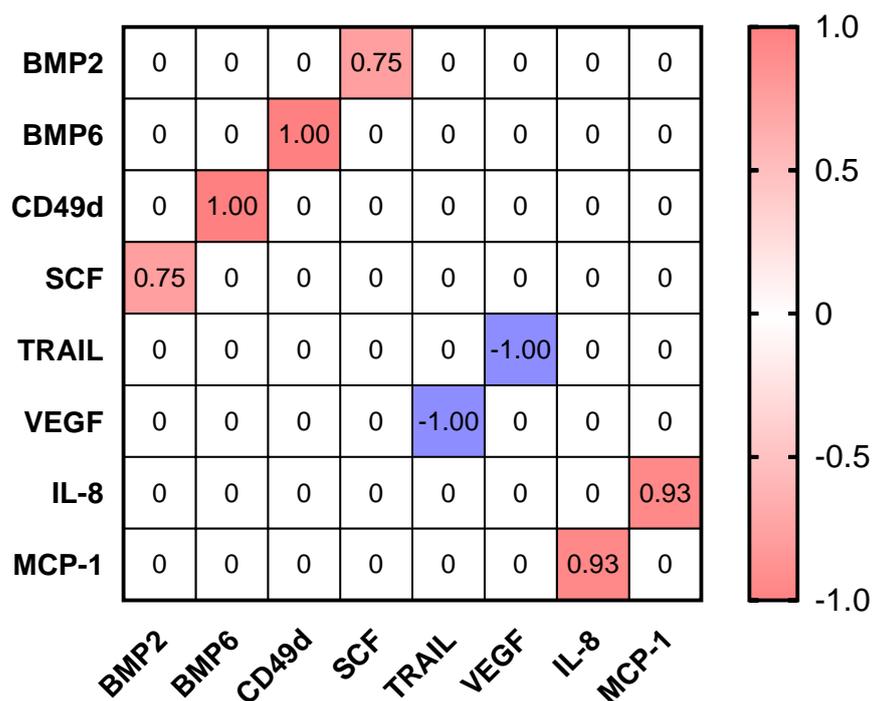


Рисунок 15. Корреляционная матрица, отражающая взаимосвязь исследуемых параметров в 2D модели с гепарином. Цветом отмечены значимые различия при $p < 0.05$. Значение в ячейках (r) характеризуют силу взаимосвязи

3D модель_гепарин

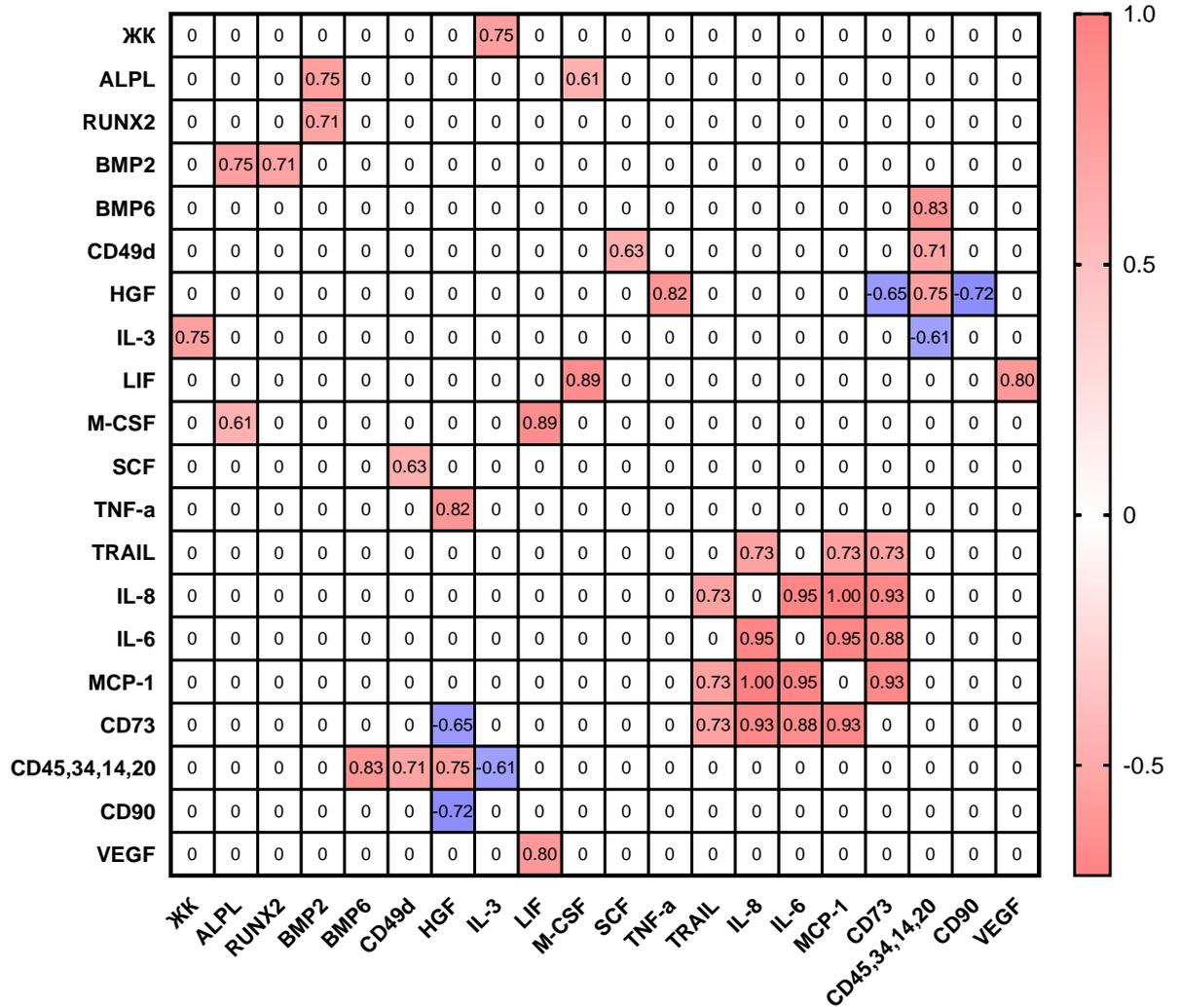


Рисунок 16. Корреляционная матрица, отражающая взаимосвязь исследуемых параметров в 3D модели с гепарином. Цветом отмечены значимые различия при $p < 0.05$. Значение в ячейках (r) характеризуют силу взаимосвязи

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТiКФ-образцы, имитирующие минеральное вещество регенерирующей костной ткани, на фоне воздействия прямого антикоагулянта (гепарин), являлись раздражителем для культуры ММСК-ЖТ человека, что выражалось в проявлении эффектов как на 14, так и на 21 сутки сокультивирования. Установлено, что совместное воздействие ТiКФ-образцов и гепарина (1 МЕ/мл) способствовало повышению остеогенного потенциала культуры ММСК-ЖТ, что сопровождалось потерей поверхностных маркеров стволовости (14 суток), а также увеличением площади минерализации межклеточного матрикса (21 день). Интересно, что в 2D модели с гепарином регистрировался самый высокий (по сравнению с остальными группами) уровень экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*RUNX2*, *ALPL*, *VMP2*, *VMP6*). Добавление ТiКФ-имплантатов и гепарина стимулировало более выраженную секрецию культурой ММСК-ЖТ ростовых факторов, хемокинов и цитокинов с провоспалительным действием по сравнению с аналогичными значениями, полученными в других экспериментальных группах. Выявлено, что используемый нами гидроксиапатит (ГАП), ионный состав которого сопоставим с минеральным веществом костной ткани, на фоне воздействия прямого антикоагулянта (гепарин), также способен оказывать влияние на морфофункциональные характеристики культуры ММСК-ЖТ человека, а именно: потенцировать снижение миграционной способности клеток через микропористую мембрану CIM-plate системы RTCA, а также адгезивной способности культуры ММСК-ЖТ (модели только с ГАП или гепарином имели менее выраженные эффекты). Важно отметить, что жизнеспособность ММСК-ЖТ оставалась в диапазоне контрольных значений при сокультивировании с имплантатом и гепарином как по отдельности, так и совместно. Интерпретируя полученные нами результаты, экспериментальное 3D-моделирование физиологической регенерации костной ткани, на фоне воздействия прямого антикоагулянта (гепарин), позволило получить новые фундаментальные знания в области физиологии, клеточной биологии и тканевой инженерии.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) обладают способностью к самообновлению и возникновению, по крайней мере, одного типа высокодифференцированных потомков [Watt F., Hogan B., 2000]. В постнатальных тканях содержатся разные типы стволовых клеток, которые способствуют поддержанию и регенерации органов и тканей. Например, костный мозг взрослого человека содержит различные типы стволовых клеток, в том числе ММСК, гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и др. [Beyer Nardi N., Silva Meirelles da L., 2006]. 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].

Титан и его сплавы уже несколько десятилетий используются для изготовления имплантатов, контактирующих с костью, благодаря их высокой биосовместимости, механическим свойствам и низкой коррозии [Wennerberg A., Albrektsson T., 2010]. Изменяя топографию поверхности имплантата, можно повысить эффективность остеоинтеграции на титановых подложках. 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]. Так, было показано влияние кальцийфосфатных (КФ) поверхностей на реализацию остеогенного потенциала ММСК костного мозга [Хлусов И. и др., 2006].

Ранее сообщалось, что гликозаминогликаны, в частности, гепарин, являются мощными индукторами активации остеогенных сигнальных путей. Ling L. et al. (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]. Кроме того,

гепарин при гиперфизиологических дозах может улучшать доставку BMP-2 *in vivo*, способствуя заживлению больших костных дефектов [Wang J. et al., 2022]. Однако, несмотря на детальное изучение процессов остеоинтеграции *in vitro* и *in vivo*, аспекты совместного влияния остеогенных искусственных матриц, 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.

Современные представления о физиологической роли гепарина основываются на его регуляторных функциях, проявляющихся в модуляции клеточных ответов при воспалительных и иммунных реакциях и др. [Умарова Б., 2000]. В то же время вопрос об участии тучноклеточного гепарина в регуляции свертывания крови до сих пор не ясен. Полагают, что из-за низкой антикоагулянтной активности гепарин тучных клеток не может оказывать какого-либо существенного влияния на гемостаз [Lindahl U., 1999]. С другой стороны, имеются сведения о корреляции содержания гепарина в тучных клетках с антикоагулянтными свойствами крови [Kitamura Y. et al, 2008], и не исключается его роль в регуляции локального свертывания в тканях [Zehnder J., Galli S., 1999]. Как уже упоминалось ранее, в нашей работе был использован спектр концентраций гепарина (0,5; 0,75; 1 МЕ/мл), близких к физиологическим, установленный нами на основании полученных экспериментальных данных *in vitro*, и результатов, освещенных в отечественной и зарубежной литературе. В частности, последние демонстрируют участие физиологического гепарина, продуцируемого тучными клетками в области раны на мышинной модели *in vivo*, что объясняет его антикоагулянтную функцию в отношении образования фибринового сгустка, способствуя заживлению раны посредством антикоагуляции и усилению активности факторов роста [Maccarana M. et al., 2022]. 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 дозах (5–500 нг/мл) [Hausser H., Brenner R., 2004].

Внутривенное введение 12,5 МЕ/мл (250 МЕ на животное весом 20 грамм) гепарина животным (мыши) считается физиологической гепаринизацией, после которой концентрация гепарина в тканях уменьшается в 4 раза [Юшков Б., 1985]. Кроме того, согласно данным коллектива отечественных авторов, концентрация гепарина до 100 мг/мл не считается высокой, поскольку не подавляет функциональной активности тканей *in vivo* [Юшков Б., 1985].

При проведении анализа действия разных концентраций гепарина на спектр изучаемых нами параметров, значительные изменения, при условии сохранения высокой жизнеспособности клеточной культуры, были выявлены только при действии на ММСК-ЖТ человека гепарина в концентрации 1 МЕ/мл (8 мкг/мл), которая и была в дальнейшем использована в настоящем *in vitro* исследовании.

Нами было выявлено, что *in vitro* сокультивирование (в течение 14 дней) ММСК-ЖТ в разных условиях (2D, 3D модели с гепарином и без него) значимо не отражалось на жизнеспособности клеточных культур - содержание живых клеток было сопоставимо с аналогичными значениями 2D модели и варьировало в пределах 94% (таблица 2). Полученные нами результаты в отношении 2D и 3D культур ММСК-ЖТ с гепарином, 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]. Ранее, нашим коллективом было показано повышение доли мертвых мононуклеарных клеток крови при контакте с TiКФ-образцами [Khlusov I. et al., 2020].

Результаты, полученные с помощью электродной системы RTСА, позволили оценить влияние нанозвеси ГАП (1 мг/мл) и гепарина (1 МЕ/мл) на способность ММСК-ЖТ человека к вертикальной миграции (инвазии) и пролиферации в условиях сокультивирования *in vitro*. В ходе проведенного эксперимента (в течение 92 часов) было выявлено, что наночастицы ГАП в присутствии гепарина (1 МЕ/мл) оказывают негативное влияние на миграционную способность ММСК-ЖТ, по сравнению с 2D моделью ММСК-ЖТ с гепарином (1 МЕ/мл), что было продемонстрировано снижением уровня ИКМ в исследуемых группах ($p < 0,05$). 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].

Следует отметить, что снижение (относительно 2D контроля) индекса клеточной миграции (ИКМ) было характерно для всех экспериментальных групп (2D и 3D модели без гепарина) (**рисунок 12, таблица 7**).

Seeger F. et al. (2012) было показано, что гепарин блокирует передачу сигналов SDF1/CXCR4, связываясь с лигандом и рецептором, препятствуя, тем самым миграции и хоумингу мононуклеарных клеток костного мозга [Seeger F. et al., 2012]. Fu D. et al. (2017) обнаружили, что поверхность с напылением ГАП в эксперименте *in vitro* обладает способностью индуцировать в ММСК-ЖТ экспрессию мРНК генов интегринов – молекул клеточной адгезии, что значительно отражалось на их способности к миграции [Fu D. et al., 2017].

Кроме того, полученные нами данные позволяют сделать вывод о снижении пролиферативной способности ММСК-ЖТ в 3D модели в присутствии гепарина (1 МЕ/мл) (**рис. 13, табл. 8**). Однако, 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]. Однако полученные нами результаты, в целом, противоречат другим данным, демонстрирующим усиление пролиферации, адгезии и увеличение жизнеспособности ММСК-ЖТ, культивируемых на синтетических носителях для регенерации костных дефектов с ГАП-покрытием, при сравнении с носителями без ГАП-покрытия [Hu J. et al., 2014]. В целом, комбинированное влияние гепарина и ГАП негативно отражается на пролиферативной способности ММСК-ЖТ, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования для изучения клеточно-молекулярных механизмов их взаимодействия.

Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что через 92 часа экспериментального культивирования наблюдалось ингибирующее действие гепарина (1 МЕ/мл) на миграционную активность ММСК-ЖТ как в присутствии, так и в отсутствии нановзвеси ГАП (1 мг/мл). Гепарин (1 МЕ/мл) оказывает

индуцирующее влияние на пролиферативную активность ММСК-ЖТ без нановзвеси ГАП. Напротив, при сокультивировании ММСК-ЖТ с гепарином (1 МЕ/мл) и взвесью наночастиц ГАП (1 мг/мл), значение показателя ИКП снижается.

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]. 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].

Таким образом, продукты деградации 3D матриксов с КФ покрытием, в кооперации с молекулами гепарина, могут являться близкодействующими триггерами *in vitro* дифференцировки и созревания части пула ММСК-ЖТ в секретирующие остеобласты, с последующей минерализацией (кальцификацией) межклеточного матрикса.

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 (*в течение 14 суток*) (табл. 3).

Согласно данным литературы, CD90 высоко экспрессируется во всех типах ММСК, высокая экспрессия этого рецептора связана с недифференцированным

статусом культуры [Sibov T. et al., 2012]. 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].

В свою очередь, экспрессия CD105 на поверхности ММСК также считается одним из важных маркеров принадлежности к этой культуре [Dominici M. et al., 2006]. Отсутствие/снижение экспрессии эндоглина (CD105) на поверхности ММСК идентифицирует данную культуру клеток, как с усиленной остеогенной дифференцировкой [Levi B. et al., 2011]. Сообщалось о прогрессирующей со временем потере экспрессии CD105 на поверхности клеток во время культивирования ММСК, полученных как из мыши, так и из человека [Gaebel R. et al., 2011].

CD73, наряду с CD90 и CD105, является одним из классических маркеров, которые специфически определяют и подтверждают популяцию ММСК [Tan K. et al., 2019]. Kimura K. et al. (2021) 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. 3**).

Следует отметить, что низкое содержание гемопоэтических клеток в 2D модели с гепарином может быть связано с используемой нами физиологической концентрации гепарина (8 мкг/мл), недостаточной для пролиферации и созревания гемопоэтических клеток. Так, Luikart S. et al. (1990), при изучении свойств HI-60 клеток, культивируемых на нормальном костномозговом матриксе, обнаружили, что их пролиферация и созревание происходит только при добавлении высокой дозы гепарина (25,6 мг/см³) [Luikart S. et al., 1990]. Аналогичные результаты приводят отечественные авторы, используя 250 ЕД/мл для гепаринизации животных и последующего получения из их костного мозга мононуклеарных клеток, способных к колониобразованию [Юшков Б., 1985].

Известно, что гемопоэтические очаги возникают в тесной связи с костной и хрящевой тканями [Assis-Ribas T. et al., 2018]. 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 [Chapman J., Zhang Y., 2020]. Остеобласты, обеспечивающие поддержание покоящейся популяции примитивных ГСК в костном мозге, являются критическими компонентами и регуляторами кроветворной ниши [Zhang J. et al., 2003]. Кроме того, из ГСК формируются остеокласты, которые являются важнейшими компонентами физиологического процесса костного ремоделирования в фазу резорбции [Zaidi M., 2007].

Резюмируя вышесказанное, 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.

Параллельно, с оценкой иммунофенотипического статуса ММСК-ЖТ, на 14 сутки нами был проведен анализ дистантного влияния TiКФ-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/узелков минерализации межклеточного матрикса в культурах ММСК-ЖТ (площадь минерализации межклеточного матрикса оценивали на пластике, около экспериментальных образцов) по истечении 21-суток культивирования.

Согласно ранее проведенным нашим коллективом работ, рельеф микродугового КФ покрытия способствует переключению дифференцировки ММСК-ЖТ человека в остеогенное и, в меньшей степени, хондрогенное направления [Khlusov I. et al., 2018]. Как уже упоминалось ранее, ионы Ca^{2+} , высвобождаемые из TiКФ-образцов, могут принимать участие в регуляции многих

видов клеточного поведения. Например, повышение концентрации внеклеточного кальция может способствовать остеогенной дифференцировке ММСК костного мозга [Cheng S. et al., 2013; Khlusov I. et al., 2018]. В ранних исследованиях сообщалось, что высвобождение ионов Ca^{2+} и Si^{4+} способствовало влиянию биоматериалов на основе силиката кальция на дифференцировку клеток на модели мышинных остеобластов [Norpe A. et al., 2011]. Более того, есть доказательства, что высвобождаемый Ca^{2+} способен индуцировать остеогенную дифференцировку, через активацию экспрессии костного морфогенетического белка BMP-2 [Barradas A. et al., 2012]. В этом же исследовании транскрипционный фактор c-Fos был идентифицирован как ген раннего ответа на Ca^{2+} , способный преобразовывать внеклеточные сигналы в изменения экспрессии генов [Barradas A. et al., 2012].

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. 4). В экспериментальных 3D моделях с гепарином и без него изучаемые показатели были значимо ниже значений, полученных в группе 2D модель с гепарином, но превышали (за исключением экспрессии гена *RUNX2*) показатели 2D контроля (табл. 4, рис. 8).

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* [Banerjee C. et al., 1997; Harada H. et al., 1999].

Относительный уровень экспрессии мРНК гена *BMP2* рос в 2D модели с гепарином в сравнении с остальными группами исследования, изучаемыми в эксперименте (табл. 4, рис. 8). В 3D модели исследования с гепарином уровень относительной экспрессии гена *BMP2* статистически значимо увеличивался относительно 2D-контроля. 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. Гепарин проявляет множество типов

биологической активности, связываясь с различными внеклеточными молекулами, тем самым играет ключевую роль в метаболизме костей. Kanzaki S. et al. (2011) показали, что гепарин оказывает комплексное воздействие на остеогенную биологическую активность *BMP2*. Так, продолжительное культивирование с гепарином, стимулировало *BMP2*-индуцированную остеогенную активность, посредством подавления антагонистов *BMP2* опосредуя дифференцировку культуры преостеобластов в сторону остеобластов [Kanzaki S. et al., 2011].

В свою очередь *BMP6* 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]. Было показано, что *BMP6* привлекает недифференцированные ММСК из окружающих тканевых источников и может стимулировать их пролиферацию и дифференцировку (в остеогенном и хондрогенном направлениях) [Song K. et al., 2010]. Mizrahi O. et al. (2013) показали, что ММСК, сверхэкспрессирующие *BMP6*, более эффективны в формировании кости, чем ММСК, сверхэкспрессирующие *BMP2* (*in vitro* и *in vivo*) [Mizrahi O. et al., 2013].

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. 4, рис. 9). *ALPL* является маркером костной ткани, экспрессия которого стимулируется обработкой морфогенетическим белком-2 (*BMP2*), активацией рецепторов BMP, а также экспрессией *Dlx5* и *RUNX2* [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]. В целом, экспрессия гена *ALPL* относится к ранним стадиям остеогенеза [Kim I.S. et al., 2008] и необходима для последующей минерализации внеклеточного матрикса [Zheng, J. et al., 2018], и проявляется к 7-14 дню после контакта с остеогенными скаффолдами [Tian T. et al., 2019], после чего уровень щелочной фосфатазы начинает снижаться [Birmingham E. et al., 2012]. Liu W. et al.

(2018) показали, что мутация *ALPL* нарушает остеогенную дифференцировку ММСК, полученных из костного мозга, из-за препятствия активации пути Wnt/ β -катенин [Liu W. et al., 2018].

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, тем самым, ключевую роль в метаболизме костной ткани. Так, Kanzaki S. et al. (2011) показали, что гепарин оказывает комплексное воздействие на остеогенную биологическую активность *BMP2*: продолжительное культивирование с гепарином, стимулировало *BMP2*-индуцированную остеогенную активность, посредством подавления антагонистов *BMP2*, опосредуя дифференцировку культуры преостеобластов в сторону остеобластов [Kanzaki S. et al., 2011]. Также 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. 16).

Интересной, на наш взгляд, 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 (1 МЕ/мл), которая может косвенно указывать на процесс формирования «ниши остеобластов» с созданием гемопозитического микроокружения в этой экспериментальной группе (рис. 16). Известно, что *BMP6* играет роль в мобилизации $CD34^+$ гемопозитических клеток [Ahmed N. et al., 2001]. Аналогичные взаимосвязи были выявлены в 3D модели без гепарина между содержанием $[CD45,34,14,20]^+$ клеток с экспрессией генов остеодифференцировки - *ALPL* и *BMP2* ($r=0,80$, $r=0,91$, $p < 0,05$) (рис. 14).

Параметры адгезии, включая плотность распределения клеток, межклеточные контакты и форма клеток, могут оказывать влияние на клеточную

дифференцировку [Wang X. et al., 2013]. Например, в работе Peng R. et al. (2011) однозначно показано, что на дифференцировку отдельной клетки, как адипогенную, так и остеогенную, в значительной степени влияет ее форма [Peng R. et al., 2011]. В исследовании Dr. Zhang L. et al. (2019) описано использование потенциально чувствительных поверхностей для регуляции адгезии, а также влияние на управление дифференцировкой стволовых клеток через адгезивную активность [Zhang L. et al., 2019]. Интересно, что Saux G. et al. (2020) показали, что остеогенная дифференцировка ММСК человека ограничивается кадгерин-опосредованными межклеточными сигналами адгезии и стимулируется интегрин-опосредованными сигналами, за счет усиления напряжения цитоскелета [Le Saux G. et al., 2020]. Так, интегрин VLA-4, экспрессирующийся на поверхности ММСК, состоит из двух субъединиц - $\alpha 4$ и $\beta 1$ (CD49d и CD29 соответственно) и принимает непосредственное участие в процессах клеточной адгезии и миграции [Chigaev A. et al., 2014]. Это было убедительно показано в экспериментах по миграции клеток *ex vivo*, свидетельствующих об участии CD49d в миграции Т-лимфоцитов в мышечную ткань [Pinto-Mariz F. et al., 2015].

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. 4, рис. 10**). 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. Известно, что чем меньше число мономеров в молекуле гепарина (например, НМГ), тем слабее оказывается его ингибирующий эффект на адгезию клеток [Schlesinger M. et al., 2009]. В 3D модели с гепарином (1 МЕ/мл) уровень экспрессии данного гена был сопоставим со значениями 2D- и 3D-контроля (**табл. 4, рис. 10**).

Выявленные нами положительные корреляционные зависимости между уровнем экспрессии *CD49d* и *BMP6* в 2D модели с гепарином ($r = 1$; $p < 0,05$), а также *CD49d* и *RUNX2* в 3D модели ($r = 0,71$; $p < 0,05$), также могут свидетельствовать о сопряженности процессов клеточной адгезии и остеогенной

дифференцировки (**рис. 14 и 15**). Положительная корреляционная взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *CD49d* и количеством [CD45,34,14,20]⁺ гемопоэтических клеток в 3D модели с гепарином ($r = 0,71$; $p < 0,05$) может быть объяснена способностью гепарина физически взаимодействовать с интегрином VLA-4 (одна из субъединиц – CD49d) (**рис. 16**). В работе Ahmed N. et al. (2001) было показано, что блокирование сигнального пути адгезии VLA-4/VCAM-1 мобилизует гемопоэтические CD34-положительные клетки [Ahmed N. et al., 2001].

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. 6**). 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.

Многочисленные исследования по влиянию гепарина на остеогенез *in vitro* и на животных моделях, демонстрируют противоречивые результаты относительно остеогенного исхода, в зависимости от вида животных или системы культивирования клеток, а также от концентраций, продолжительности и типов используемых фракций гепарина [Simann M. et al., 2015].

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]. В отличие от этих результатов, другие авторы показали, что длительное культивирование ММСК, полученных из костного мозга с гепарином (в концентрации 160 нг/мл) практически не влияло на их остеогенную, хондрогенную и адипогенную дифференцировку [Ling L. et al., 2016]. Как уже упоминалось ранее, гепарин, за счет физического взаимодействия с лигандом Wnt3a, усиливает передачу сигналов в каноническом Wnt- сигнальном пути через повышение уровней β -катенина, что в конечном итоге, влияет на

выработку щелочной фосфатазы, генерируя, таким образом, более мощный остеогенный сигнал линии преosteобластов [Ling L. et al., 2010].

Топография поверхности, в свою очередь, имеет основополагающее значение для адгезии и дифференцировки остеобластов, адсорбции белков и, таким образом, для скорости остеоинтеграции материала [Matos G., 2021]. К тому же было продемонстрировано, что прикрепление остеобластов усиливалось к структурам субмикронного масштаба, но не к гладким поверхностям. [Le Guéhennec L. et al., 2007]. Используемый в нашем исследовании трехмерный матрикс с КФ покрытием с шероховатостью 2-3 мкм, вполне соответствует физиологической модели регенерации костной ткани и играет решающую роль в определении судьбы клеточной культуры [Хлусов И. и др., 2018; Lertsuwan K. et al., 2020].

Резюмируя вышесказанное, выявленное нами повышение (в сравнении с 2D моделями с гепарином и без него) экспрессии мРНК генов остеоидифференцировки (*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 остеоидифференцировки ММСК-ЖТ при моделировании механизмов остеоинтеграции в условиях сокультивирования *in vitro*.

Становится очевидным, что минерализация межклеточного вещества культуры ММСК-ЖТ, обусловленная их дифференцировкой и созреванием в остеобласты при взаимодействии с образцами с КФ покрытием протекает в условиях не только изменения иммунофенотипического профиля ММСК-ЖТ и экспрессии генов, но и ауто- и паракринной секреции регуляторных биомолекул (ростовых факторов, хемокинов, провоспалительных цитокинов и т.д.).

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/отсутствии гепарина, их секреторная способность претерпевала значительные изменения (табл. 5).

Весьма интересные результаты были получены при анализе содержания продуцируемых ММСК-ЖТ факторов в супернатантах клеточных культур 2D

модели с гепарином (**табл. 5**). Согласно данным литературы, гепарин взаимодействует с большим количеством биологически активных молекул (цитокинов) [Mummery R., Rider C., 2000; Le Gall J. et al., 2021], потенциально продлевая период их полужизни за счет защиты от протеолитической деградации или усиления их сигнальной способности, опосредованной взаимодействием с рецептором на клеточной поверхности [Chiodeli P. et al., 2015; Luo L. et al., 2019].

Однако, 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-1a, 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 (табл. 5)**.

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]. Кроме того, в другом исследовании было показано, что основной сульфатированный гликозаминогликан стромы костного мозга мыши, гепарансульфат, обладает способностью адсорбировать как GM-CSF, так и IL-3. Интересно, что *in vivo* эти факторы роста после связывания могут быть представлены в биологически активной форме гемопоэтическим клеткам в костном мозге [Roberts R. et al., 1988].

Однако, 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]. Эти же авторы предполагают, что гепарин влияет на ряд взаимодействий цитокинов и рецепторов, которые изменяют внутриклеточные сигнальные каскады и профили клеточной экспрессии, включая VEGF и IL-6.

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/другая ситуация наблюдалась при анализе цитокинпродуцирующей активности ММСК-ЖТ в 3D моделях с гепарином и без него.

Спустя 14 дней сокультивирования, уровень ростового фактора HGF (Hepatocyte growth factor) в 3D модели с гепарином был значительно выше, чем в остальных группах исследования (**табл. 5**). Ранее было продемонстрировано, что ростовой фактор HGF вносит решающий вклад в миграцию, пролиферацию, дифференцировку и выживаемость культуры ММСК [Witt R. et al., 2017]. HGF инициирует клеточную передачу сигналов посредством связывания с рецептором тирозинкиназы MET (сMET), что может привести к усилению миграции, снижению пролиферации и потере стволовых маркеров через активацию сигнальных путей (PI3K-Akt, MEK-MAPK и STAT3) [Frisch R. et al., 2016; Liu J. et al., 2018; Fan Y. et al., 2019]. Увеличение продукции данного ростового фактора в 3D модели с гепарином может свидетельствовать о потере стволовости ММСК-ЖТ в связи с активацией процесса остеодифференцировки клеток, опосредованной действием гепарина и продуктов биodeградации КФ-покрытия. Кроме того, данные литературы свидетельствуют, что является полифункциональным цитокином в микроокружении костного мозга. Он продуцируется стромальными клетками костного мозга человека и прямо или косвенно способствует пролиферации, адгезии и выживанию гемопоэтических клеток [Weimar I. et al., 1998; Tajima F. et al., 2004].

Недавно исследователи показали, что рецептор этого фактора с-Met также существует на мембране остеокласта и его клетки-предшественницы, и HGF может заменять M-CSF, чтобы способствовать дифференцировке мононуклеарных клеток периферической крови человека, которые дифференцируются 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; HGF с CD73 клетками ($r = -0,80$, $p < 0,05$) в 3D модели без гепарина (**рис. 14 и 16**).

Нами была получена положительная корреляционная взаимосвязь между продукцией HGF и ингибирующим лейкемию фактором (LIF) (Leukemia inhibitory factor) в 3D модели исследования ($r = 1$; $p < 0,05$) (**рис. 14**). HGF и LIF являются многофункциональными цитокинами, участвующими в нормальном развитии и регенерации тканей. Tomida M. et al. (2003) предположили, что активация STAT3 и экспрессия гена *HGF*, в основном, зависят от LIF, продуцируемого эндогенно [Tomida M., Saito T., 2004]. В 3D модели с гепарином нами обнаружена положительная корреляция между HGF и TNF- α ($r = 0,82$; $p < 0,05$) (**рис. 16**). Известно, что TNF- α , продуцируемый моноцитами, активированных опухолью, приводит к усилению регуляции HGF и c-Met, взаимодействие которых способно синергетически включать активацию сигнального пути HGF-c-Met [Zhang X., 2020]. Возможно, что медиаторы воспаления, секретируемые гемопозитическими клетками, присутствующими в культуре (**табл. 3**), способны индуцировать продукцию ММСК-ЖТ ростового фактора HGF, вносящего решающий вклад в остеодифференцировочный процесс.

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. 5**). Биологические свойства LIF включают индукцию ремоделирования кости, нейропротекцию, регуляцию гемопоэза и др. [Santos G. et al., 2020]. Важно отметить, что аналогично действию IL-6, IL-11 и онкостатина, LIF является мощным стимулятором RANKL в клетках линии остеобластов, включая остециты [Sims N., 2021].

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, стимулируя секрецию важных медиаторов с проангиогенным действием, 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. 16**).

Полученная нами положительная корреляция в 3D модели с гепарином между содержанием LIF и макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) в супернатантах культур ($r = 0,89$; $p < 0,05$) (**рис. 16**) свидетельствует о

присутствии в культуре ММСК пула гемопоэтических клеток. LIF и M-CSF - представители группы гемопоэтических цитокинов, выполняющие основную роль в контроле развития и имплантации эмбриона, а значит участвующие в процессах клеточной пролиферации и дифференцировки [Oshima K. et al., 2003]. Так M-CSF, взаимодействуя с RANKL, способен активировать остеокласты, которые в дальнейшем также способны секретировать ростовой фактор LIF [Udagawa N. et al., 2021].

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. 5**).

M-CSF является гемопоэтическим фактором роста, стимулирующим выживание, пролиферацию, дифференцировку клеток из мононуклеарной линии [Hume D., MacDonald K., 2012].

Данные относительно действия этого фактора на формирование кости носят противоречивый характер: некоторые авторы предполагают, что передача сигналов M-CSF ограничивает образование остеокластов, и, тем самым, защищает кость, в то время как другие предполагают, что M-CSF стимулирует остеокластогенез [Starlinger J. et al., 2021]. В исследовании Dai X. et al. (2002) было четко продемонстрировано, что мыши с дефицитом M-CSF страдают от задержки роста скелета и остеопетроза [Dai X. et al., 2002].

Полученная нами положительная корреляция в 3D модели между содержанием фактора M-CSF с количеством гемопоэтических клеток ($r = 0,74$; $p < 0,05$) и $CD73^+$ ($r = 0,73$; $p < 0,05$) клеток, может свидетельствовать о стабилизации ниши гемопоэтических стволовых клеток за счет продукции ММСК-ЖТ, и возможно, $[CD45,34,14,20]^+$ клетками - M-CSF, в данной экспериментальной группе (**рис. 14**). Также нами были получены положительные корреляции в 3D модели между M-CSF и SCF ($r = 1$; $p < 0,05$), TNF- α ($r = 1$; $p < 0,05$) (**рис. 14**). В некоторых работах показана аутологичная продукция M-CSF и SCF в различных клеточных линиях человека *in vitro* [Lawicki S. et al, 2008]. В исследовании Kitaura H. et al. (2005) было обнаружено, что TNF- α стимулировал экспрессию гена *M-CSF in vivo* [Kitaura H. et al., 2005]. M-CSF в предшественниках остеокластов индуцировал ключевой рецептор остеокластогенных цитокинов (RANK). Таким

образом, в 3D модели данная корреляция может свидетельствовать в пользу активации остеокластов – непосредственных участников ремоделирования костной ткани. 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. 16**), 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. 5**). Ранее исследователями было продемонстрировано, что SCF стимулирует секрецию металлопротеиназ ММСК-ЖТ, что может играть решающую роль в инициации миграции и хоуминга ММСК в поврежденную ткань [Enciso N. et al., 2018]. К тому же фактор SCF является важным регулятором регенеративных процессов, определяющим дифференцировку стволовых и прогениторных клеток [Зубкова Е. и др., 2017]. Также было обнаружено, что за счет сверхэкспрессии SCF культурой ММСК, успешно интегрируются клеточные линии после трансплантации, сохраняя свою жизнеспособность на уровне контрольных значений [Dergilev K. et al., 2020]. Мы предполагаем, что достаточная продукция ростового фактора SCF в 3D моделях с гепарином и без него может положительно влиять на процессы пролиферации и дифференцировки ММСК-ЖТ.

В 2D модели с гепарином нами была получена положительная корреляция между продукцией ростового фактора SCF и уровнем экспрессии *BMP2* ($r = 0,75$; $p < 0,05$) (**рис. 15**), что подтверждает наличие ранней остеодифференцировки в данной экспериментальной группе. Стоит отметить наличие положительной корреляции между продукцией SCF и экспрессией гена *CD49d* в 3D модели с гепарином ($r = 0,63$; $p < 0,05$) (**рис. 16**), 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, значительно отличающаяся от всех экспериментальных групп (**табл. 5**). Известно, что IL-3 секретируется активированными Т-лимфоцитами и является основным цитокином,

принимающим участие в регуляции гепомоза [Yang, Clark, 1989; Kumar A. et al., 2020]. Кроме того, показано, что IL-3 способен предотвращать повреждение костей и хрящей на животных моделях ревматоидного артрита и остеоартрита человека [Srivastava R. et al., 2011; Kour S. et al., 2016]. IL-3 также способствует дифференцировке ММСК человека в функциональные остеобласты и увеличивает их регенеративный потенциал *in vivo* у мышей с ослабленным иммунитетом [Barhanpurkar A. et al., 2012]. Barhanpurkar-Naik A. et al. (2017) обнаружено, что IL-3 значительно усиливает миграцию, подвижность и способность ММСК к заживлению ран, путем усиления экспрессии хемокинового рецептора CXCR4. Более того, IL-3-индуцированная экспрессия CXCR4 приводит к повышению миграционного потенциала ММСК в сторону SDF-1 α [Barhanpurkar-Naik A. et al., 2017]. Повышенная продукция данного цитокина в 3D модели с гепарином может косвенно свидетельствовать об увеличенном остеогенном и миграционном потенциале ММСК-ЖТ в этой группе исследования.

В 3D модели с гепарином нами была получены положительная корреляция между продукцией ростового фактора IL-3 и количеством жизнеспособных клеток ($r = 0,75$; $p < 0,05$) (**рис. 16**), 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 (**табл. 5**). VEGF является мощным ангиогенным фактором, усиливающим дифференцировку эндотелиальных клеток *in vitro* и потенцирующим неоваскуляризацию [Ge Q. et al., 2018]. Косвенным эффектом VEGF является инициация клеточной судьбы ММСК в сторону остеогенной линии, что индуцирует большее количество остеобластов в месте заживления, за счет чего проявляется двойной эффект фактора VEGF [Berendsen A., Olsen B., 2014; Li B. et al., 2016]. Ориентируясь на данные литературы, повышенная продукция VEGF в группе исследования с гепарином и TiКФ-образцами, может быть связана с процессами ангиогенеза и остеогенным потенциалом воздействующих на ММСК-ЖТ факторов [K. Hu, B.R. Olsen, 2017].

В 2D модели с гепарином нами была получена отрицательная корреляция между VEGF и TRAIL ($r = -1$; $p < 0,05$) (**рис. 15**). Известно, что TRAIL блокирует

экспрессию мРНК гена *VEGF*, ингибируя, таким образом, процесс ангиогенеза [Cantarella G. et al., 2006].

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. 5). TNF- α - основной медиатор воспалительной реакции, способствующий привлечению воспалительных и стромальных клеток [Vallés G. et al., 2020]. TNF- α является многофункциональным цитокином, участвующим в контроле воспаления, развитии вторичных лимфоидных органов и иммунной регуляции [Kallioliás G., Ivashkiv L., 2016]. Помимо участия в регуляции воспаления, важной защитной функцией передачи сигналов TNF/TNFR1 является локальная активация коагуляции в мелких кровеносных сосудах для ограничения пораженного участка от кровотока [Poll van der T. et al., 1996]. 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. 5). IL-6 является плеiotропным цитокином и синтезируется многими типами клеток, включая моноциты, Т-клетки, фибробласты и эндотелиальные клетки и др. [Schaper F., Rose-John S., 2015]. IL-6, как правило, рассматривается как провоспалительный фактор; однако тот факт, что IL-6 обладает как противовоспалительной, так и модулирующей провоспалительной активностью, часто упускается из виду. IL-6 является ключевым игроком в сохранении функции ММСК в качестве клетки-предшественницы и является вспомогательным фактором в пролиферации ММСК [Dregalla R. et al., 2022]. Так, в работе Dorronsoro A. et al. (2020) было продемонстрировано, что блокирование секреции IL-6 не влияло на выживаемость ММСК из костного мозга, однако снижало их пролиферацию, ингибируя

прогрессирование клеточного цикла посредством регуляции внутриклеточного сигнального пути [Dorronsoro A. et al., 2020].

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. 16**). 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. 5**). TRAIL является членом суперсемейства TNF и взаимодействует с их рецепторами [Rochette L. et al., 2019]. Потенциально, TRAIL представляет собой молекулу с двойным действием: первое из которых это инициация апоптоза и стимуляция воспаления, а второе способствует выживанию клеток и подавляет воспалительный процесс [Rochette L. et al., 2019]. Противоположные эффекты фактора TRAIL зависят от его концентрации. Относительно недавно было показано, что TRAIL индуцирует дифференцировку остеокластов посредством TRAF6-зависимого сигнального пути и ингибирует дифференцировку остеокластов, индуцированную лигандом RANK (RANKL) [Liao H. et al., 2019].

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. 16**). 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 хемокинового и гемопоетического фактора SDF-1a в супернатантах 14-дневных культур в 3D модели с гепарином в сравнении со всеми экспериментальными группами (**табл. 5**). Известно, что SDF-1a может усиливать пролиферацию, миграцию ММСК, а также их антиапоптотическую способность, улучшая, тем самым, выживаемость клеточных трансплантатов. Также SDF-1a участвует в мобилизации и рекрутировании стволовых клеток и клеток-предшественниц, экспрессирующих на своей поверхности рецептор CXCR4 для связывания с SDF-1a [Li Q. et al., 2016]. Повышенная продукция этого хемокина в культурах с ТiКФ

образцами и гепарином может свидетельствовать об увеличении миграционного потенциала ММСК-ЖТ на 14 сутки культивирования. В 3D модели (без гепарина), напротив, отмечен низкий уровень продукции данного хемокина.

Количество моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) в группе 3D модель_гепарин было статистически ниже значений 2D контроля, но превышало таковой в 2D модели с гепарином, что может свидетельствовать об ингибировании гепарином продукции данного фактора (табл. 5). Одной из основных ролей MCP-1 является рекрутирование моноцитов, а также макрофагов, но он также влияет на активацию моноцитов и поляризацию макрофагов [Deshmane S. et al., 2009]. Однако 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].

Производство хемокина IL-8 в модели с TiКФ-образцом и гепарином было значительно 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. 5). IL-8, также известный как CXCL8 или нейтрофил-активирующий белок-1 (NAP-1), является членом семейства хемокинов CXС. Основным биологическим эффектом IL-8 является привлечение и активация нейтрофилов [Wang J. et al., 2015]. IL-8 является первым хемокином, обладающим проангиогенными свойствами, функция которого была подтверждена при различных типах опухолей, включая рак яичников, рак молочной железы и другие виды рака [Pecot C. et al., 2013].

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. 16**), что позволяет предположить эти клетки в качестве продуцентов вышеуказанных факторов.

Таким образом, резюмируя вышесказанное, активность ММСК-ЖТ в 2D модели с гепарином (1 МЕ/мл) в отношении продукции ростовых факторов (**HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3**), медиаторов с провоспалительной (**TNF α , TRAIL**) и хемоаттрактантной (**SDF-1 α , MCP-1, IL-8**) активностью, была ниже, чем в контроле и 3D модели с гепарином (1 МЕ/мл) и без него. Исключение составили - **VEGF и IL-6**. В 3D модели с гепарином, напротив, 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.

Кроме того, как уже упоминалось ранее, в регуляции RANKL, важного фактора дифференцировки остеокластов, участвуют многие медиаторы, в том числе, исследованные нами - **LIF, M-CSF, SCF, IL-3, TNF α , TRAIL, MCP-1, IL-8 и IL-6**. Учитывая выявленные нами многочисленные взаимосвязи вышеперечисленных факторов с содержанием гемопоэтических клеток, мы предполагаем, что это может свидетельствовать в пользу активации остеокластов – непосредственных участников ремоделирования костной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами экспериментальное *in vitro* 3D-моделирование функционирования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (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. Так, нами выявлено, что совместное воздействие ТiКФ-образцов (посредством продуктов биodeградации) и гепарина (1 МЕ/мл) активировало *in vitro* дифференцировку культуры ММСК-ЖТ в остеобласты, что сопровождалось увеличением площади минерализации межклеточного матрикса на пластике, подтвержденное с помощью цитологического окрашивания ализариновым красным (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 интегрина *CD49d*, также может свидетельствовать об индукции процесса остеодифференцировки. На 14-е сутки в трёхмерной модели дистантного культивирования с гепарином (1 МЕ/мл) 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 биodeградации (ионами кальция) на эффективное формирование *in vitro* прообраза системы "кость/костный мозг". Данный тезис подтверждается многочисленными взаимосвязями исследуемых факторов с экспрессией генов остеодифференцировки и числом клеток с фенотипом гемопоэтических. Следует отметить, что жизнеспособность культур ММСК-ЖТ, в условиях 2D- и 3D культивирования с гепарином (1 МЕ/мл) не изменялась, в то время как пролиферативная активность в группах с ТiКФ-образцами и гепарином (1 МЕ/мл) достоверно понижалась в сравнении с 2D моделью с гепарином.

Полученные нами результаты, в целом, неоднозначны и требуют дальнейшего изучения. В целом, 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.

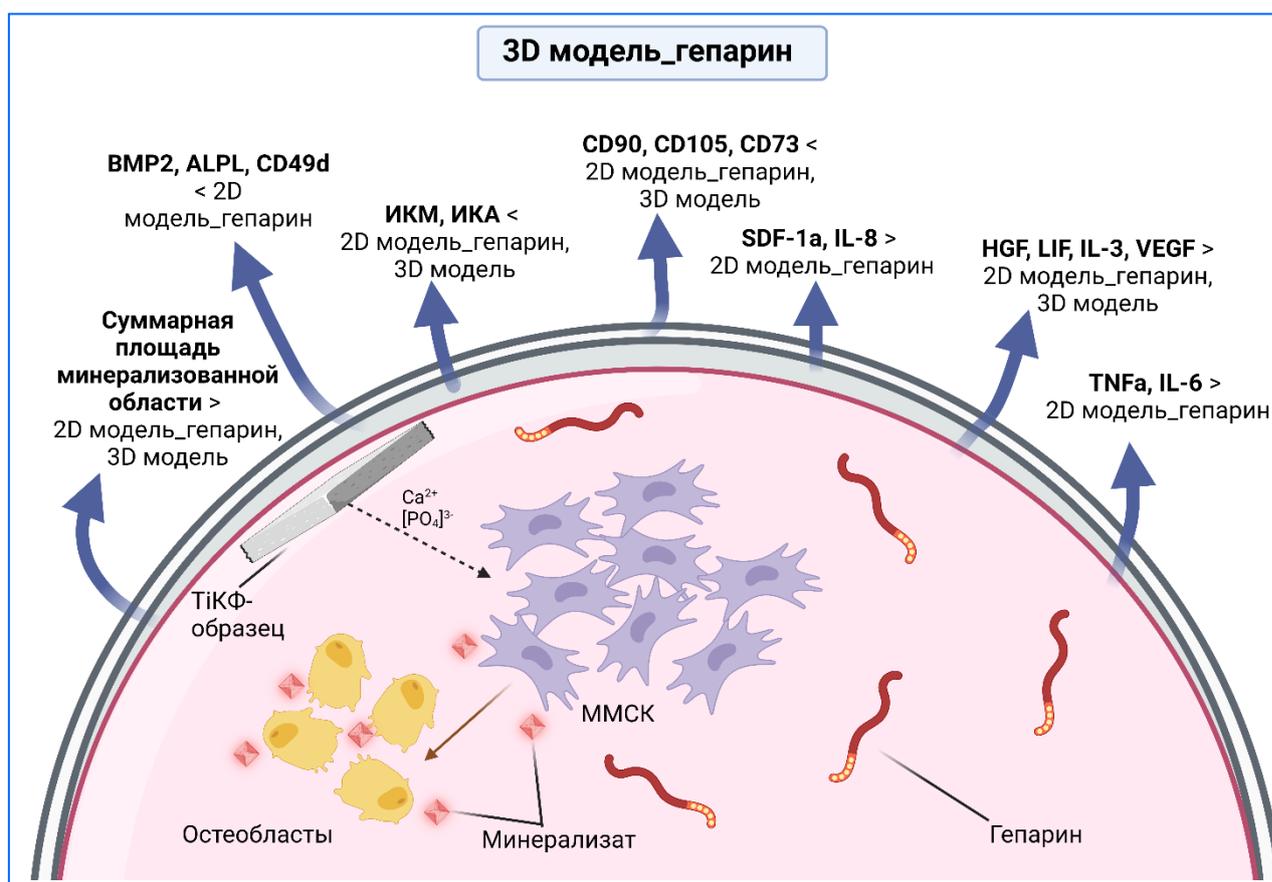


Рисунок 17. Схема, отражающая регуляторные механизмы остеогенеза (в сравнительном аспекте), в условиях *дистантного in vitro* культивирования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека с трёхмерным скаффолдом с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральный матрикс костной ткани и прямым антикоагулянтом – гепарином (1 МЕ/мл)

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 (TNF α , TRAIL) и хемоаттрактантной (SDF-1 α , 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-1 α , 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 трёхмерной 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 биodeградации), клетками и сигнальными молекулами (цитокины, факторы роста и др.), опосредованной модулирующим действием гепарина.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Т.М. Травматизм в Российской Федерации на основе данных статистики / Т.М. Андреева // Социальные аспекты здоровья населения. – 2010. – Т. 16, № 4. – 2 с.
2. Зависимость остеогенных свойств клеток костного мозга от рельефа и растворимости кальцийфосфатных поверхностей / Хлусов И.А., Карлов А.В., Поженько К.С. [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 1. – С. 107–112.
3. Концепция «Ниша рельеф» для стволовых клеток как основа биомиметического подхода к инженерии костной и кроветворной тканей / И. А. Хлусов, Н. М. Шевцова, М. Ю. Хлусова [и др.] // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 55-64.
4. Коршунов Д.А. Современные достижения и проблемы в исследовании культур клеток / Д.А. Коршунов, И.В. Кондакова // Успехи Современной Биологии. – 2016. – Т. 136, № 4. – С. 347-361.
5. Кремер Н.Ш. Практикум по высшей математике для экономистов / Н.Ш. Кремер // Учебное пособие для вузов. – 2004. – 479 с.
6. Моделирование микроокружения мезенхимных стволовых клеток как перспективный подход к тканевой инженерии и регенеративной медицине (краткий обзор) / И.А. Хлусов, Л.С. Литвинова, К.А. Юрова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 217-228.
7. Остеогенные и ангиогенные свойства гепарина как системы доставки биомолекул при биоинженерии кости: краткий критический обзор / Л.С. Литвинова, К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2020. – Т. 66. – С. 431-436.
8. Получение генетически-модифицированных МСК жировой ткани, продуцирующих SDF-1A и SCF, для использования в регенеративной медицине / Е.С. Зубкова, Ю.С. Стафеев, Е.К. Шевченко [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12, № 3. – С. 99.
9. Секреция сигнальных молекул кроветворных ниш в условиях остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, индуцированной рельефным кальций-фосфатным покрытием / Л.С. Литвинова,

- В.В. Шуплецова, К.А. Юрова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2019. – Т. 65, № 4. – С. 339-346.
10. Стимулирующее влияние высоких доз гепарина на миграционную активность и сохранение стволовости МСК в присутствии остеозамещающих материалов / И.К. Норкин, К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 831-838.
 11. Умарова Б.А. Гепарин тучных клеток в адаптивных реакциях организма: дис. д-ра биол. наук: 03.00.13 / Умарова Белла Анверовна. - 2000. – 303 с.
 12. Шахпазян Н.К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н.К. Шахпазян, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 23-33.
 13. Юшков Б.Г. Гликозаминогликаны и стволовые кроветворные клетки в норме и при опухолевом росте / Б.Г. Юшков // Стволовые клетки и опухолевый рост. – 1985. – С. 74-77.
 14. Юшков, Б.Г. Гликопротеины и гемопоэз: монография / Б.Г. Юшков, Г.К. Попов, М.В. Северин [и др.] // – Екатеринбург: Уральский государственный медицинский институт. – 1994. – 127 с.
 15. A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells / A.M.C. Barradas, H.A.M. Fernandes, N. Groen [et al.] // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33, № 11. – P. 3205-3215.
 16. A heparan sulfate-containing fraction of bone marrow stroma induces maturation of HL-60 cells in vitro / S.D. Luikart, C.A. Maniglia, L.T. Furcht [et al.] // Cancer Research. – 1990. – Vol. 50, № 12. – P. 3781-3785.
 17. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells / D.A. Moraes, T.T. Sibov, L.F. Pavon [et al.] // Stem Cell Research & Therapy. – 2016. – Vol. 7. – P. 97.
 18. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation / G. Kaur, O.P. Pandey, K. Singh [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research. Part A. – 2014. – Vol. 102, № 1. – P. 254-274.

19. A toxicity study of multiple-administration human umbilical cord mesenchymal stem cells in cynomolgus monkeys / Y. Wang, Z. Han, J. Ma [et al.] // *Stem Cells and Development*. – 2012. – Vol. 21, № 9. – P. 1401-1408.
20. Adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells on porous titanium surfaces with strontium-doped hydroxyapatite coating / D. Fu, Q. Jiang, F. He [et al.] // *Journal of Zhejiang University. Science. B*. – 2017. – Vol. 18, № 9. – P. 778-788.
21. Adhesion, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells on RGD nanopatterns of varied nanospacings / X. Wang, K. Ye, Z. Li [et al.] // *Organogenesis*. – 2013. – Vol. 9, № 4. – P. 280-286.
22. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have a Heterogenic Cytokine Secretion Profile / Y. Wu, M.J. Hoogduijn, C.C. Baan [et al.] // *Stem Cells International*. – 2017. – Vol. 2017. – 7 p.
23. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function / T.C. Moon, C.D. St Laurent, K.E. Morris [et al.] // *Mucosal Immunology*. – 2010. – Vol. 3, № 2. – P. 111-128.
24. Aerts F. Mesenchymal Stem Cell Engineering and Transplantation / F. Aerts, G. Wagemaker // *Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells*. – 2006. – P. 1-44.
25. Aggarwal S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M.F. Pittenger // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, № 4. – P. 1815-1822.
26. Alkaline Phosphatase Controls Lineage Switching of Mesenchymal Stem Cells by Regulating the LRP6/GSK3 β Complex in Hypophosphatasia / W. Liu, L. Zhang, K. Xuan [et al.] // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8, № 20. – P. 5575-5592.
27. Ambrosi T.H. A Revised Perspective of Skeletal Stem Cell Biology / T.H. Ambrosi, M.T. Longaker, C.K.F. Chan // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2019. – Vol. 7. – P. 189.
28. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia / A. Cuker, G.M. Arepally, B.H. Chong [et al.] // *Blood Advances*. – 2018. – Vol. 2, № 22. – P. 3360-3392.
29. Amini A.R. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges / A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu // *Critical reviews in biomedical engineering*. – 2012. – Vol. 40, № 5. – P. 363-408.

30. Andrzejewska A. Mesenchymal stem cells: from roots to boost / A. Andrzejewska, B. Lukomska, M. Janowski // *Stem cells*. – 2019. – Vol. 37, № 7. – P. 855-864.
31. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials / K. Anselme // *Biomaterials*. – 2000. – Vol. 7, № 21. – P. 667–681.
32. Antiangiogenic and anticancer effect of an orally active low molecular weight heparin conjugates and its application to lung cancer chemoprevention / J. Kim, T.A. Al-Hilal, S.W. Chung [et al.] // *J Control Release*. – 2015. – Vol. 10, № 199. – P. 122-131.
33. Antitumor Activity of DFX117 by Dual Inhibition of c-Met and PI3K α in Non-Small Cell Lung Cancer / Y. Fan, H. Ding, D. Kim [et al.] // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11, № 5. – P. 627.
34. Artificial matrices with high-sulfated glycosaminoglycans and collagen are anti-inflammatory and pro-osteogenic for human mesenchymal stromal cells / U. Hempel, C. Matthäus, C. Preissler [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2014. – Vol. 115, № 9. – P. 1561-1571.
35. Autologous cell-based therapy for treatment of large bone defects: from bench to bedside / R. Verboket, M. Leiblein, C. Seebach [et al.] // *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. – 2018. – Vol. 44, № 5. – P. 649-665.
36. Babbush C.A. Titanium plasma-sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible / C.A. Babbush, J.N. Kent, D.J. Misiak // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. – 1986. – Vol. 44, № 4. – P. 274-282.
37. Berendsen A.D. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells / A.D. Berendsen, B.R. Olsen // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*. – 2014. – Vol. 62, № 2. – P. 103-108.
38. Bernardo M.E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation / M.E. Bernardo, W.E. Fibbe // *Cell Stem Cell*. – 2013. – Vol. 13, № 4. – P. 392-402.
39. Beyer Nardi N. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization / N. Beyer Nardi, L. da Silva Meirelles // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2006. – № 174. – P. 249-282.

40. Bianco P. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications / P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos [et al.] // *Stem Cells* (Dayton, Ohio). – 2001. – Vol. 19, № 3. – P. 180-192.
41. Bianco P. Skeletal stem cells / P. Bianco, P.G. Robey // *Development*. – 2015. – Vol. 142, № 6. – P. 1023-1027.
42. Binding between heparin and the integrin VLA-4 / M. Schlesinger, D. Simonis, P. Schmitz [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Vol. 102, № 5. – P. 816-822.
43. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration / G. Thrivikraman, A. Athirasala, C. Twohig [et al.] // *Dental clinics of North America*. – 2017. – Vol. 61, № 4. – P. 835-856.
44. Biophysical Regulation of Cell Behavior-Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography / Y. Yang, K. Wang, X. Gu [et al.] // *Engineering (Beijing)*. – 2017. – Vol. 3, № 1. – P. 36– 54.
45. Birgersdotter A. Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems / A. Birgersdotter, R. Sandberg, I. Ernberg // *Seminars in Cancer Biology*. – 2005. – Vol. 15, № 5. – P. 405-412.
46. BMP-6 is more efficient in bone formation than BMP-2 when overexpressed in mesenchymal stem cells / O. Mizrahi, D. Sheyn, W. Tawackoli [et al.] // *Gene Therapy*. – 2013. – Vol. 20, № 4. – P. 370-377.
47. Bolten S.N. Heparin: role in protein purification and substitution with animal-component free material / S.N. Bolten, U. Rinas, T. Scheper // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 102, № 20. – P. 8647-8660.
48. Bone marrow CD73+ mesenchymal stem cells display increased stemness in vitro and promote fracture healing in vivo / K. Kimura, M. Breitbach, F.A. Schildberg [et al.] // *Bone Reports*. – 2021. – Vol. 15. – P. 101-133.
49. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Aging and Tissue Engineering Applications to Enhance Bone Healing / H. Lin, J. Sohn, H. Shen [et al.] // *Biomaterials*. – 2019. – Vol. 203. – P. 96-110.
50. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2—dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production / K. Németh, A. Leelahavanichkul, P.S.T. Yuen [et al.] // *Nature medicine*. – 2009. – Vol. 15, № 1. – P. 42-49.

51. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer / J. Wang, Y. Wang, S. Wang [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 40. – P. 42825-42837.
52. Bone Mesenchymal Stem Cells with Growth Factors Successfully Treat Nonunions and Delayed Unions / P. Desai, S.M. Hasan, L. Zambrana [et al.] // *HSS Journal*. – 2015. – Vol. 11, № 2. – P. 104-111.
53. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2 / Y.J. Kim, M. Lee, J.M. Wozney [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 49. – P. 50773-50780.
54. Bone regeneration strategies: engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells Current stage and future perspectives / A. Ho-Shui-Ling, J. Bolander, L.E. Rustom [et al.] // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 180. – P. 143-162.
55. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture / A. Schindeler, M.M. McDonald, P. Bokko [et al.] // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2008. – Vol. 19, № 5. – P. 459-466.
56. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices / T.-M. De Witte, L.E. Fratila-Apachitei, A.A. Zadpoor [et al.] // *Regenerative Biomaterials*. – 2018. – Vol. 5, № 4. – P. 197-211.
57. Boomsma R.A. Mesenchymal Stem Cells Secrete Multiple Cytokines That Promote Angiogenesis and Have Contrasting Effects on Chemotaxis and Apoptosis / R.A. Boomsma, D.L. Geenen // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. e35685.
58. Breeland, G. Embryology, Bone Ossification / G. Breeland, A.S. Margaret, G.M. Ritesh // *StatPearls*. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
59. Broeke J. Image Processing with ImageJ - 2nd Edition / J. Broeke, J.M. Mateos Pérez, J. Pascau. – 2015. – 7 p.
60. Bussey H. Heparin overview and issues / H. Bussey, J.L. Francis, Heparin Consensus Group // *Pharmacotherapy*. – 2004. – Vol. 24, № 8. – P. 103-107.
61. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys / R. Narayanan, S.K. Seshadri, T.Y. Kwon [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. – 2008. – Vol. 85, № 1. – P. 279-299.

62. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation / H. Harada, S. Tagashira, M. Fujiwara [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274, № 11. – P. 6972-6978.
63. CD105 Protein Depletion Enhances Human Adipose-derived Stromal Cell Osteogenesis through Reduction of Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) Signaling / B. Levi, D.C. Wan, J.P. Glotzbach [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, № 45. – P. 39497-39509.
64. CD49d is a disease progression biomarker and a potential target for immunotherapy in Duchenne muscular dystrophy / F. Pinto-Mariz, L.R. Carvalho, A.P. De Queiroz Campos Araujo [et al.] // *Skeletal Muscle*. – 2015. – Vol. 5. – P. 45.
65. CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity / K. Tan, H. Zhu, J. Zhang [et al.] // *Stem Cells International*. – 2019. – Vol. 2019. – 12 p.
66. Cell based therapy for the treatment of femoral head necrosis / U. Nöth, J. Reichert, S. Reppenhagen [et al.] // *Der Orthopade*. – 2007. – Vol. 36, № 5. – P. 466-471.
67. Cell Origin of Human Mesenchymal Stem Cells Determines a Different Healing Performance in Cardiac Regeneration / R. Gaebel, D. Furlani, H. Sorg [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, № 2. – P. e15652.
68. Cell Sheet Comprised of Mesenchymal Stromal Cells Overexpressing Stem Cell Factor Promotes Epicardium Activation and Heart Function Improvement in a Rat Model of Myocardium Infarction / K.V. Dergilev, E.K. Shevchenko, Z.I. Tsokolaeva [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 24. – P. 9603.
69. Cell–Cell Adhesion-Driven Contact Guidance and Its Effect on Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation / G. Le Saux, M.C. Wu, E. Toledo [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2020. – Vol. 12, № 20. – P. 22399-22409.
70. Chapman J. *Histology, Hematopoiesis* / J. Chapman, Y. Zhang. – StatPearls Publishing. - 2021.
71. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells / M.K. Majumdar, M. Keane-Moore, D. Buyaner [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2003. – Vol. 10, № 2. – P. 228-241.
72. Chemokine stromal cell-derived factor 1/CXCL12 increases homing of mesenchymal stem cells to injured myocardium and neovascularization following myocardial infarction

- / Y. Zhuang, X. Chen, M. Xu [et al.] // Chinese Medical Journal. – 2009. – Vol. 122, № 2. – P. 183-187.
73. Chigaev A. Carbon monoxide down-regulates $\alpha 4\beta 1$ integrin-specific ligand binding and cell adhesion: a possible mechanism for cell mobilization / A. Chigaev, Y. Smagley, L.A. Sklar // BMC Immunology. – 2014. – Vol. 15. – P. 52.
74. Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model / A.R. Costa-Pinto, V.M. Correlo, P.C. Sol [et al.] // Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 21-28.
75. Claes L. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions / L. Claes, S. Recknagel, A. Ignatius // Nature Reviews. Rheumatology. – 2012. – Vol. 8, № 3. – P. 133-143.
76. Colnot C. Skeletal Cell Fate Decisions Within Periosteum and Bone Marrow During Bone Regeneration / C. Colnot // Journal of Bone and Mineral Research. – 2009. – Vol. 24, № 2. – P. 274-282.
77. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy / H.J. Jin, Y.K. Bae, M. Kim [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – Vol. 14, № 9. – P. 17986-18001.
78. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix: proliferation and multilineage differentiation as compared to mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and bone marrow / J. Hua, J. Gong, H. Meng [et al.] // Cell Biology International. – 2013. – P. 198-210.
79. Comparison of Low-Molecular-Weight Heparins Prepared From Ovine Heparins With Enoxaparin / J. Chen, Y. Yu, J. Fareed [et al.] // Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. – 2019. – Vol. 25. – P. 542-553.
80. Comprehensive study on laboratory biomarkers for prediction and diagnosis of deep venous thrombosis / M.F. Ghazlan, A.A. Osman, H.M. Mahmoud [et al.] // Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis. – 2015. – Vol. 26, № 3. – P. 255-260.

81. Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration / F. Nitzsche, C. Müller, B. Lukomska [et al.] // STEM CELLS. – 2017. – Vol. 35, № 6. – P. 1446-1460.
82. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair / S. Maxson, E.A. Lopez, D. Yoo [et al.] // Stem Cells Translational Medicine. – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 142-149.
83. Conditioned Medium from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Rats: An Original Strategy to Avoid Cell Transplantation / D. Cantinieaux, R. Quertainmont, S. Blacher [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. e69515.
84. Controlled release of BMP-2 using a heparin-conjugated carrier system reduces in vivo adipose tissue formation / J. Lee, S. Lee, B. Kim [et al.] // J Biomed Mater Res A. – 2015. – Vol. 103, № 2. – P. 545-554.
85. Controlled release of corticosteroid with biodegradable nanoparticles for treating experimental autoimmune uveitis / L. Luo, J. Yang, Y. Oh [et al.] // Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society. – 2019. – Vol. 296. – P. 68-80.
86. Costa-Pinto A.R. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan / A.R. Costa-Pinto, R.L. Reis, N.M. Neves // Tissue Engineering. Part B, Reviews. – 2011. – Vol. 17, № 5. – P. 331-347.
87. Costimulatory Effect of Rough Calcium Phosphate Coating and Blood Mononuclear Cells on Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro as a Model of In Vivo Tissue Repair / I.A. Khlusov, L.S Litvinova, V.V. Shupletsova [et al.] // Materials. – 2020. – Vol. 13, № 19. – P. 1-31.
88. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype / R. Romieu-Mourez, M. François, M. Boivin [et al.] // Journal of Immunology. – 2009. – Vol. 182, № 12. – P. 7963-7973.
89. Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Profile Characterization of Undifferentiated and Osteoinduced Human Adipose-Derived Stem Cells / F. Mussano, T. Genova, M. Corsalini [et al.] // Stem Cells International. – 2017. – Vol. 2017. – 11 p.

90. Dellatore S.M. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion / S.M. Dellatore, A.S. Garcia, W.M. Miller // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2008. – Vol. 19, № 5. – P. 534-540.
91. Design of hydrogels to stabilize and enhance bone morphogenetic protein activity by heparin mimetics / S. Kim, Z. Cui, P.J. Kim [et al.] // *Acta Biomater.* – 2018. - № 72. – P. 45-54.
92. Designing optimal calcium phosphate scaffold-cell combinations using an integrative model-based approach / A. Carrier, Y.C. Chai, M. Moesen [et al.] // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7, № 10. – P. 3573–3585.
93. Differential effects of Fe²⁺ and Fe³⁺ on osteoblasts and the effects of 1,25(OH)₂D₃, deferiprone and extracellular calcium on osteoblast viability under iron-overloaded conditions / K. Lertsuwan, K. Nammultriputtar, S. Nanthawuttiphon [et al.] // *PLoS ONE*. – 2020. – Vol. 15, № 5. – P. e0234009.
94. Distinct Effects of IL-6 Classic and Trans-Signaling in Bone Fracture Healing / K. Prystaz, K. Kaiser, A. Kovtun [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2018. – Vol. 188, № 2. – P. 474-490.
95. Dual effects of heparin on BMP-2-induced osteogenic activity in MC3T3-E1 cells / S. Kanzaki, W. Ariyoshi, T. Takahashi [et al.] // *Pharmacological Reports*. – 2011. – Vol. 63, № 5. – P. 1222-1230.
96. Dunlop L.L. Relationships between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial-mesenchymal interactions in initiation of osteogenesis / L.L. Dunlop, B.K. Hall // *The International Journal of Developmental Biology*. – 1995. – Vol. 39, № 2. – P. 357-371.
97. Effect of bone morphogenetic protein-6 on haemopoietic stem cells and cytokine production in normal human bone marrow stroma / N. Ahmed, J. Sammons, R.J. Carson [et al.] // *Cell Biology International*. – 2001. – Vol. 25, № 5. – P. 429-435.
98. Effect of heparin on proliferation mesenchymal stem cell / A. Susanto, B. Winata, A. Wijaya [et al.] // *Cytotherapy*. – 2019. – Vol. 21, № 5. – P. 87-88.
99. Effect of heparin on the biological properties and molecular signature of human mesenchymal stem cells / L. Ling, E.T. Camilleri, T. Helledie [et al.] // *Gene*. – 2016. – Vol. 576, № 1. – P. 292-303.

100. Effect of nano-hydroxyapatite coating on the osteoinductivity of porous biphasic calcium phosphate ceramics / J. Hu, Y. Zhou, L. Huang [et al.] // *BMC Musculoskeletal Disorders*. – 2014. – Vol. 15. – P. 114.
101. Effects of extracellular calcium on viability and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells in vitro / S. Cheng, W. Wang, Z. Lin [et al.] // *Human Cell*. – 2013. – Vol. 26, № 3. – P. 114-120.
102. Efficacy and safety of fondaparinux for the prevention of venous thromboembolism in older acute medical patients: randomised placebo controlled trial / A.T. Cohen, B.L. Davidson, A.S. Gallus [et al.] // *BMJ : British Medical Journal*. – 2006. – Vol. 332, № 7537. – P. 325-329.
103. Einhorn T.A. Fracture healing: mechanisms and interventions / T.A. Einhorn, L.C. Gerstenfeld // *Nature reviews. Rheumatology*. – 2015. – Vol. 11, № 1. – P. 45-54.
104. Eliaz N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications / N. Eliaz, N. Metoki // *Materials*. – 2017. – Vol. 10, № 4. – P. 334.
105. Emergency hospitalizations for adverse drug events in older Americans / D.S. Budnitz, M.C. Lovegrove, N. Shehab [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 365, № 21. – P. 2002-2012.
106. Endogenous heparan sulfate and heparin modulate bone morphogenetic protein-4 signaling and activity / S.A. Khan, S.M. Nelson, C. Pan [et al.] // *AJP Cell Physiology*. – 2008. – Vol. 294, № 6. – P. 1387-1397.
107. Enhanced Antiviral Function of Magnesium Chloride-Modified Heparin on a Broad Spectrum of Viruses / K. Mese, O. Bunz, W. Volkwein [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 18. – 14 p.
108. Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells / P. Niemeyer, U. Krause, J. Fellenberg [et al.] // *Cells, Tissues, Organs*. – 2004. – Vol. 177, № 2. – P. 68-78.
109. Exogenous heparin binds and inhibits bone morphogenetic protein 6 biological activity / J. Brkljacic, M. Pauk, I. Erjavec [et al.] // *Int Orthop*. – 2013. – Vol. 37, № 3. – P. 529-541.

110. Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation / T. Assis-Ribas, M. F. Forni, S. M. B. Winnischofer [et al.] // *Dev. Biol.* – 2018. – P. 437, № 2. – P. 63–74.
111. Fibrin clots obtained from plasma containing heparin show a higher sensitivity to t-PA-induced lysis / G.G. Nenci, P. Parise, M. Morini [et al.] // *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis.* – 1992. – Vol. 3, № 3. – P. 279-285.
112. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation / L.C. Gerstenfeld, D.M. Cullinane, G.L. Barnes [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry.* – 2003. – Vol. 88, № 5. – P. 873-884.
113. Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification / L.J. Raggatt, M.E. Wullschleger, K.A. Alexander [et al.] // *The American Journal of Pathology.* – 2014. – Vol. 184, № 12. – P. 3192-3204.
114. Friedenstein A.J. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells / A.J. Friedenstein, I.I. Piatetzky-Shapiro, K.V. Petrakova // *Journal of Embryology and Experimental Morphology.* – 1966. – Vol. 16, № 3. – P. 381-390.
115. Friedenstein A.J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells / A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhjan, K.S. Lalykina // *Cell and Tissue Kinetics.* – 1970. – Vol. 3, № 4. – P. 393-403.
116. Frieri M. Analysis of the effect of mast cell granules on lymphocyte blastogenesis in the absence and presence of mitogens: identification of heparin as a granule-associated suppressor factor / M. Frieri, D.D. Metcalfe // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950).* – 1983. – Vol. 131, № 4. – P. 1942-1948.
117. Gene expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in bovine endometrium during early pregnancy / K. Oshima, H. Watanabe, K. Yoshihara [et al.] // *Theriogenology.* – 2003. – Vol. 60, № 7. – P. 1217-1226.
118. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated / K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky [et al.] // *Nature Reviews. Immunology.* – 2007. – Vol. 7, № 9. – P. 678-689.

119. Ghaffari-Nazari H. The known molecules involved in MSC homing and migration / H. Ghaffari-Nazari // *Journal of Stem Cell Research and Medicine*. – 2018. – Vol. 3, № 1. – 4 p.
120. Glycosaminoglycan content of a mineralized collagen scaffold promotes mesenchymal stem cell secretion of factors to modulate angiogenesis and monocyte differentiation / M.J. Dewey, V. Kolliopoulos, M.T. Ngo [et al.] // *Materialia*. – 2021. – Vol. 18. – P. 101149.
121. Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells / S. Mathews, S.A. Mathew, P.K. Gupta [et al.] // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2014. – Vol. 8, № 2. – P. 143-152.
122. Gorbet M.B. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes / M.B. Gorbet, M.V. Sefton // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25, № 26. – P. 5681-5703.
123. Growth factor regulation of fracture repair / G.L. Barnes, P.J. Kostenuik, L.C. Gerstenfeld [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 1999. – Vol. 14, № 11. – P. 1805-1815.
124. Growth factors and cytokines in wound healing / S. Barrientos, O. Stojadinovic, M.S. Golinko [et al.] // *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. – 2008. – Vol. 16, № 5. – P. 585-601.
125. Guided osteoporotic bone regeneration with composite scaffolds of mineralized ECM/heparin membrane loaded with BMP2-related peptide / T. Sun, M. Liu, S. Yao [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2018. – Vol. 13. – P. 791-804.
126. Habibovic P. Strategic Directions in Osteoinduction and Biomimetics / P. Habibovic // *Tissue Engineering. Part A*. – 2017. – Vol. 23, № 23-24. – P. 1295-1296.
127. Hall B.K. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development / B.K. Hall, T. Miyake // *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. – 2000. – Vol. 22, № 2. – P. 138-147.
128. Hanson S.R. Chapter 15 Device thrombosis and thromboembolism / S.R. Hanson // *Cardiovascular Pathology*. – 1993. – Vol. 2, № 3. – P. 157-165.

129. Hausser H.-J. Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro / H.-J. Hausser, R.E. Brenner // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2004. – Vol. 91, № 5. – P. 1062-1073.
130. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? / H.B. Nader, S.F. Chavante, E.A. dos-Santos [et al.] // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 1999. – Vol. 32, № 5. – P. 529-538.
131. Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis / R. Roberts, J. Gallagher, E. Spooncer [et al.] // *Nature*. – 1988. – Vol. 332, № 6162. – P. 376-378.
132. Heparin affects human bone marrow stromal cell fate: Promoting osteogenic and reducing adipogenic differentiation and conversion / M. Simann, V. Schneider, S. Le Blanc [et al.] // *Bone*. – 2015. – Vol. 78. – P. 102-113.
133. Heparin and heparan sulfate bind interleukin-10 and modulate its activity / S. Salek-Ardakani, J.R. Arrand, D. Shaw [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 96, № 5. – P. 1879-1888.
134. Heparin and Its Derivatives: Challenges and Advances in Therapeutic Biomolecules / N. Banik, S. Yang, T. Kang [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 19. – 15 p.
135. Heparin Anticoagulant for Human Bone Marrow Does Not Influence In Vitro Performance of Human Mesenchymal Stromal Cells / Y. Roger, L. Burmeister, A. Hamm [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 7. – 24 p.
136. Heparin disrupts the CXCR4/SDF-1 axis and impairs the functional capacity of bone marrow-derived mononuclear cells used for cardiovascular repair / F.H. Seeger, T. Rasper, A. Fischer [et al.] // *Circulation Research*. – 2012. – Vol. 111, № 7. – P. 854-862.
137. Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity / A. Irie, M. Takami, H. Kubo [et al.] // *Bone*. – 2007. – Vol. 41, № 2. – P. 165-174.
138. Heparin is biocompatible and can induce differentiation of human dental pulp cells / E.M. Rodrigues, A.L.G. Cornélio, P.H. Godoi [et al.] // *Int Endod J*. – 2019. – Vol. 52, № 6. – P. 829-837.

139. Heparin modification of a biomimetic bone matrix modulates osteogenic and angiogenic cell response in vitro / M. Quade, S. Knaack, D. Weber [et al.] // *Eur Cell Mater.* – 2017. - № 33. – P. 105-120.
140. Heparin Potentiates the in Vivo Ectopic Bone Formation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 / B. Zhao, T. Katagiri, H. Toyoda [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2006. – Vol. 281, № 32. – P. 23246-23253.
141. Heparin/Heparan Sulfate Proteoglycans Glycomic Interactome in Angiogenesis: Biological Implications and Therapeutical Use / P. Chiodelli, A. Bugatti, C. Urbinati [et al.] // *Molecules.* – 2015. – Vol. 20, № 4. – P. 6342-6388.
142. Heparin-Based Polyelectrolyte Complex Enhances the Therapeutic Efficacy of Bone Morphogenetic Protein-2 for Posterolateral Fusion in a Large Animal Model / M. Wang, R.W. Lam, S.A. Abbah [et al.] // *Spine.* – 2016. – Vol. 41, № 15. – P. 1199-1207.
143. Hepatocyte Growth Factor and Alternative Splice Variants - Expression, Regulation and Implications in Osteogenesis and Bone Health and Repair / R.N. Frisch, K.M. Curtis, K.K. Aenlle [et al.] // *Expert opinion on therapeutic targets.* – 2016. – Vol. 20, № 9. – P. 1087-1098.
144. Hepatocyte growth factor overexpression promotes osteoclastogenesis and exacerbates bone loss in CIA mice / C. Huang, Y. Zheng, J. Bai [et al.] // *Journal of Orthopaedic Translation.* – 2020. – Vol. 27. – P. 9-16.
145. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+) / I.S. Weimar, N. Miranda, E.J. Muller [et al.] // *Experimental Hematology.* – 1998. – Vol. 26, № 9. – P. 885-894.
146. HGF as a Strong Mobilizer of Hematopoietic Stem Cells to Peripheral Blood. / F. Tajima, Y. Nakamura, Y. Murawaki [et al.] // *Blood.* – 2004. – Vol. 104, № 11. – P. 1188.
147. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans / T. Mochizuki, T. Muneta, Y. Sakaguchi [et al.] // *Arthritis and Rheumatism.* – 2006. – Vol. 54, № 3. – P. 843-853.

148. Highly Sensitive Detection Method of Retinoblastoma Genetic Predisposition and Biomarkers / J. Le Gall, C. Dehainault, C. Benoist [et al.] // *The Journal of molecular diagnostics: JMD*. – 2021. – Vol. 23, № 12. – P. 1714-1721.
149. Holmer E. The molecular-weight dependence of the rate-enhancing effect of heparin on the inhibition of thrombin, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa and kallikrein by antithrombin. / E. Holmer, K. Kurachi, G. Söderström // *Biochemical Journal*. – 1981. – Vol. 193, № 2. – P. 395-400.
150. Holmes D. Closing the gap / D. Holmes // *Nature*. – 2017. – Vol. 550, № 7677. – P. 194-195.
151. Holmes D. Non-union bone fracture: a quicker fix / D. Holmes // *Nature*. – 2017. – Vol. 550, № 7677. – P. 193.
152. Holt D.J. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair / D.J. Holt, D.W. Grainger // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2012. – Vol. 64, № 12. – P. 1123-1128.
153. Hoppe A. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics / A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, № 11. – P. 2757-2774.
154. Hu K. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration / K. Hu, B.R. Olsen // *Bone*. – 2016. – Vol. 91. – P. 30–38.
155. Human adipose stem cells induced to osteogenic differentiation by an innovative collagen/hydroxylapatite hybrid scaffold / E. Mazzoni, A. D'Agostino, M. Manfrini [et al.] // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2017. – Vol. 31, № 10. – P. 4555-4565.
156. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord / C. Qiao, W. Xu, W. Zhu [et al.] // *Cell Biology International*. – 2008. – Vol. 32, № 1. – P. 8-15.
157. Hume D.A. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling / D.A. Hume, K.P.A. MacDonald // *Blood*. – 2012. – Vol. 119, № 8. – P. 1810-1820.
158. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix / M.J. Sawkins, W. Bowen, P. Dhadha [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2013. – Vol. 9, № 8. – P. 7865-7873.

159. ICAM-1/LFA-1 interaction contributes to the induction of endothelial cell-cell separation: implication for enhanced leukocyte diapedesis / H. Wee, H. Oh, J. Jo [et al.] // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2009. – Vol. 41, № 5. – P. 341-348.
160. Identification of a Key Residue Mediating Bone Morphogenetic Protein (BMP)-6 Resistance to Noggin Inhibition Allows for Engineered BMPs with Superior Agonist Activity / K. Song, C. Krause, S. Shi [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285, № 16. – P. 12169-12180.
161. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size / J. Zhang, C. Niu, L. Ye [et al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 425, № 6960. – P. 836–841.
162. IL-3 attenuates collagen-induced arthritis by modulating the development of Foxp3⁺ regulatory T cells / R.K. Srivastava, G.B. Tomar, A.P. Barhanpurkar [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186, № 4. – P. 2262-2272.
163. IL-3 Decreases Cartilage Degeneration by Downregulating Matrix Metalloproteinases and Reduces Joint Destruction in Osteoarthritic Mice / S. Kour, M.G. Garimella, D.A. Shiroor [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2016. – Vol. 196, № 12. – P. 5024-5035.
164. IL-3 promotes osteoblast differentiation and bone formation in human mesenchymal stem cells / A.P. Barhanpurkar, N. Gupta, R.K. Srivastava [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2012. – Vol. 418, № 4. – P. 669-675.
165. IL-3 Receptor Expression on Activated Human Th Cells Is Regulated by IL-4, and IL-3 Synergizes with IL-4 to Enhance Th2 Cell Differentiation / A. Kumar, L. Rani, S.T. Mhaske [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2020. – Vol. 204, № 4. – P. 819-831.
166. Ilizarov bone transport as a treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: a long-term follow-up study / J. Vanderstappen, J. Lammens, P. Berger [et al.] // *Journal of Children's Orthopaedics*. – 2015. – Vol. 9, № 4. – P. 319-324.
167. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials / S. Franz, S. Rammelt, D. Scharnweber [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, № 28. – P. 6692-6709.
168. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders / S. Zhao, R. Wehner, M. Bornhäuser [et al.] // *Stem Cells and Development*. – 2010. – Vol. 19, № 5. – P. 607-614.

169. Impaired growth plate function in *bmp-6* null mice / M.J. Perry, K.E. McDougall, S. Hou [et al.] // *Bone*. – 2008. – Vol. 42, № 1. – P. 216-225.
170. Implications of Heparanase on Heparin Synthesis and Metabolism in Mast Cells / M. Maccarana, J. Jia, H. Li [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 9. – P. 4821.
171. Improving translation success of cell-based therapies in orthopaedics / J.J. Bara, M. Herrmann, C.H. Evans [et al.] // *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. – 2016. – Vol. 34, № 1. – P. 17-21.
172. In vitro and in vivo evaluation of osteogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on partially demineralized bone matrix / G. Liu, Y. Li, J. Sun [et al.] // *Tissue Engineering. Part A*. – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 971-982.
173. In vitro response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone morphogenic protein-2 in the early and late stages of 107 osteoblast differentiation / I. S. Kim, Y. M. Song, T. H. Cho [et al.] // *Dev. Growth Differ.* – 2008. – Vol. 50, № 7. – P. 553–564.
174. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis / P. Garnero, E. Sornay-Rendu, M.C. Chapuy [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 1996. – Vol. 11, № 3. – P. 337-349.
175. Influence of inflammatory conditions provided by macrophages on osteogenic ability of mesenchymal stem cells / G. Vallés, F. Bensiamar, L. Maestro-Paramio [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2020. – Vol. 11. – P. 57.
176. Inhibition of IKK/NF- κ B Signaling Enhances Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells from Human Embryonic Stem Cells / P. Deng, C. Zhou, R. Alvarez [et al.] // *Stem Cell Reports*. – 2016. – Vol. 6, № 4. – P. 456-465.
177. Inhibition of Rac and ROCK signalling influence osteoblast adhesion, differentiation and mineralization on titanium topographies / P.D.H. Prowse, C.G. Elliott, J. Hutter [et al.] // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8, № 3. – P. e58898.
178. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth / M.R. Iaquinta, E. Mazzoni, M. Manfrini [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 618.

179. Interleukin-3 enhances the migration of human mesenchymal stem cells by regulating expression of CXCR4 / A. Barhanpurkar-Naik, S.T. Mhaske, S.T. Pote [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. – Vol. 8. – P. 168.
180. Intracellular role of IL-6 in mesenchymal stromal cell immunosuppression and proliferation / A. Dorronsoro, V. Lang, I. Ferrin [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 21853.
181. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? / J. Street, D. Winter, J.H. Wang [et al.] // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2000. – № 378. – P. 224-237.
182. Jaffe E.A. Cell biology of endothelial cells / E.A. Jaffe // *Human Pathology*. – 1987. – Vol. 18, № 3. – P. 234-239.
183. Jiang W. Immune modulation by mesenchymal stem cells / W. Jiang, J. Xu // *Cell Proliferation*. – 2019. – Vol. 53, № 1. – P. e12712.
184. Kalliolias G.D. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies / G.D. Kalliolias, L.B. Ivashkiv // *Nature Reviews. Rheumatology*. – 2016. – Vol. 12, № 1. – P. 49-62.
185. Karp J.M. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details / J.M. Karp, G.S. Leng Teo // *Cell Stem Cell*. – 2009. – Vol. 4, № 3. – P. 206-216.
186. Kitamura Y. Transdifferentiation between Mast Cell Subpopulations / Y. Kitamura, T. Nakano, Y. Kanakura // *Development, Growth & Differentiation*. – 2008. – Vol. 28. – P. 321-325.
187. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome / H. Kupcova Skalnikova // *Biochimie*. – 2013. – Vol. 95, № 12. – P. 2196-2211.
188. Kurella A. Review paper: surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering / A. Kurella, N.B. Dahotre // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2005. – Vol. 20, № 1. – P. 5-50.
189. Labarrere C.A. Thrombogenic and Inflammatory Reactions to Biomaterials in Medical Devices / C.A. Labarrere, A.E. Dabiri, G.S. Kassab // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – 18 p.
190. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Overexpression Increases the Angiogenic Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells / G.C. Santos, D.N. Silva,

- V. Fortuna [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 778.
191. Li Y. Local Inhibition of Complement Improves Mesenchymal Stem Cell Viability and Function After Administration / Y. Li, J. Fung, F. Lin // *Molecular Therapy*. – 2016. – Vol. 24, № 9. – P. 1665-1674.
192. Libby P. Inflammation and thrombosis: the clot thickens / P. Libby, D.I. Simon // *Circulation*. – 2001. – Vol. 103. – № 13. – P. 1718-1720.
193. Lindahl U. What else can ‘Heparin’ do? / U. Lindahl // *Haemostasis*. – 1999. – Vol. 29. – P. 38-47.
194. Linhardt R.J. Heparin: structure and activity / R.J. Linhardt // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2003. – Vol. 46, № 13. – P. 2551-2564.
195. Lioubavina-Hack N. Significance of primary stability for osseointegration of dental implants / N. Lioubavina-Hack, N.P. Lang, T. Karring // *Clinical Oral Implants Research*. – 2006. – Vol. 17, № 3. – P. 244-250.
196. Lobb R.R. Purification of heparin-binding growth factors / R.R. Lobb, J.W. Harper, J.W. Fett // *Analytical Biochemistry*. – 1986. – Vol. 154, № 1. – P. 1-14.
197. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage / F. Long // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2011. – Vol. 13, № 1. – P. 27-38.
198. Lowered Expression of Heparan Sulfate/Heparin Biosynthesis Enzyme N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 1 Results in Increased Sulfation of Mast Cell Heparin / A. Dagälv, K. Holmborn, L. Kjellén [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, № 52. – P. 44433-44440.
199. Lymphocyte/Macrophage Interactions: Biomaterial Surface-Dependent Cytokine, Chemokine, and Matrix Protein Production / D.T. Chang, J.A. Jones, H. Meyerson [et al.] // *Journal of biomedical materials research. Part A*. – 2008. – Vol. 87, № 3. – P. 676-687.
200. Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion / W.G. Brodbeck, M. Macewan, E. Colton [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2005. – Vol. 74, № 2. – P. 222-229.
201. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification / C. Schlundt, T.E. Khassawna, A. Serra [et al.] // *Bone*. – 2018. – Vol. 106. – P. 78-89.

202. Material surfaces affect the protein expression patterns of human macrophages: A proteomics approach / D.L.M. Dinnes, H. Marçal, S.M. Mahler [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A.* – 2007. – Vol. 80, № 4. – P. 895-908.
203. Matos G.R.M. Surface Roughness of Dental Implant and Osseointegration / G.R.M. Matos // *Journal of Maxillofacial & Oral Surgery.* – 2021. – Vol. 20, № 1. – P. 1-4.
204. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis / H. Kitaura, P. Zhou, H. Kim [et al.] // *Journal of Clinical Investigation.* – 2005. – Vol. 115, № 12. – P. 3418-3427.
205. Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate / S. Laner-Plamberger, T. Lener, D. Schmid [et al.] // *Journal of Translational Medicine.* – 2015. – Vol. 13. – P. 354.
206. Mechanism of Action and Pharmacology of Unfractionated Heparin / J. Hirsh, S.S. Anand, J.L. Halperin [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2001. – Vol. 21, № 7. – P. 1094-1096.
207. Mechanochemical Synthesis of Nonstoichiometric and Substituted Apatites with Nanosized Particles for Use as Biologically Compatible Materials / M.V. Chaikina, I.A. Khlusov, A.V. Karlov [et al.] // *Chemistry for Sustainable Development.* - 2004. - Vol. 12. – P. 385-394.
208. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review / C.J. Wilson, R.E. Clegg, D.I. Leavesley [et al.] // *Tissue Engineering.* – 2005. – Vol. 11, № 1-2. – P. 1-18.
209. Meng J. Cell adhesive spectra along surface wettability gradient from superhydrophilicity to superhydrophobicity / J. Meng // *Sci. China Chem.* – 2017. – Vol. 5, № 60. – P. 614–620.
210. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia / N.A. Zambetti, Z. Ping, S. Chen [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2016. – Vol. 19, № 5. – P. 613-627.
211. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair / X. Fu, G. Liu, A. Halim [et al.] // *Cells.* – 2019. – Vol. 8, № 8. – P. 784.

212. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects / F. Gao, S.M. Chiu, D.A.L. Motan [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. e2062.
213. Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering / R. Witt, A. Weigand, A.M. Boos [et al.] // *BMC Cell Biology*. – 2017. – Vol. 18. – P. 15.
214. Mesenchymal stem cells exhibit firm adhesion, crawling, spreading and transmigration across aortic endothelial cells: effects of chemokines and shear / G. Chamberlain, H. Smith, G.E. Rainger [et al.] // *PloS One*. – 2011. – Vol. 6, № 9. – P. e25663.
215. Mesenchymal Stem Cells Facilitate Fracture Repair in an Alcohol-Induced Impaired Healing Model / T. Obermeyer, D. Yonick, K. Lauing [et al.] // *Journal of orthopaedic trauma*. – 2012. – Vol. 26, № 12. – P. 712-718.
216. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation / T.T. Sibov, P. Severino, L.C. Marti [et al.] // *Cytotechnology*. – 2012. – Vol. 64, № 5. – P. 511-521.
217. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects / P. Kangari, T. Talaei-Khozani, I. Razeghian-Jahromi [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2020. – Vol. 11. – P. 492.
218. Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders / A. Markov, L. Thangavelu, S. Aravindhan [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2021. – Vol. 12. – P. 192.
219. Micro-Nano Bioactive Glass Particles Incorporated Porous Scaffold for Promoting Osteogenesis and Angiogenesis in vitro / T. Tian, W. Xie, W. Gao [et al.] // *Front. Chem*. – 2019. – Vol. 7. – P. 186.
220. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.] // *Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315-317.
221. Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis / Z.S. Al-Aql, A.S. Alagl, D.T. Graves [et al.] // *Journal of dental research*. – 2008. – Vol. 87, № 2. – P. 107-118.

222. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview / S.L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini [et al.] // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. – 2009. – Vol. 29, № 6. – P. 313-326.
223. Moon T.C. Mast Cell Mediators: Their Differential Release and the Secretory Pathways Involved / T.C. Moon, A.D. Befus, M. Kulka // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – 18 p.
224. Mouse mesenchymal stem cells inhibit high endothelial cell activation and lymphocyte homing to lymph nodes by releasing TIMP-1 / L. Zanotti, R. Angioni, B. Cali [et al.] // *Leukemia*. – 2016. – Vol. 30, № 5. – P. 1143-1154.
225. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno [et al.] // *Tissue Engineering*. – 2001. – Vol. 7. – P. 211-228.
226. Mummery R.S. Characterization of the heparin-binding properties of IL-6 / R.S. Mummery, C.C. Rider // *Journal of Immunology*. – 2000. – Vol. 165, № 10. – P. 5671-5679.
227. Murugan R. Development of nanocomposites for bone grafting: 20th Anniversary Special Issue / R. Murugan, S. Ramakrishna // *Composites Science and Technology*. – 2005. – Vol. 65, № 15. – P. 2385-2406.
228. Nanoscale Electrical Potential and Roughness of a Calcium Phosphate Surface Promotes the Osteogenic Phenotype of Stromal Cells / I.A. Khlusov, Y. Dekhtyar, Y.P. Sharkeev [et al.] // *Materials*. – 2018. – Vol. 11, № 6. – P. 978.
229. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period / P.I. Brånemark, B.O. Hansson, R. Adell [et al.] // *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery. Supplementum*. – 1977. – Vol. 16. – P. 1-132.
230. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit / P.R. Klokkevold, R.D. Nishimura, M. Adachi [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. – 1997. – Vol. 8, № 6. – P. 442-447.
231. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review / R. Brånemark, P.I. Brånemark, B. Rydevik [et al.] // *Journal of Rehabilitation Research and Development*. – 2001. – Vol. 38, № 2. – P. 175-181.

232. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways / N. Udagawa, M. Koide, M. Nakamura [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. – 2021. – Vol. 39, № 1. – P. 19-26.
233. Osteogenic and angiogenic properties of heparin as a system of biomolecule delivery for bone bioengineering: A brief critical review / L. Litvinova, K.A. Yurova, O.G. Khaziakhmatova [et al.] // *Biomeditsinskaya Khimiya*. – 2020. – Vol. 66. – P. 431-436.
234. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche / E. Birmingham, G.L. Niebur, P.E. McHugh [et al.] // *European Cells & Materials*. – 2012. – Vol. 23. – P. 13-27.
235. Paracrine interleukin-8 affects mesenchymal stem cells through the Akt pathway and enhances human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration / L. Wang, Y. Li, X. Zhang [et al.] // *Bioscience Reports*. – 2021. – Vol. 41, № 5. – 18 p.
236. Peng R. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion / R. Peng, X. Yao, J. Ding // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, № 32. – P. 8048-8057.
237. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin / O. Duchamp de Lageneste, A. Julien, R. Abou-Khalil [et al.] // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9. – P. 773.
238. Perretti M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation / M. Perretti // *General Pharmacology*. – 1998. – Vol. 31, № 4. – P. 545-552.
239. Pharmacological venous thromboembolism prophylaxis in hospitalized medical patients: a meta-analysis of randomized controlled trials / L. Wein, S. Wein, S.J. Haas [et al.] // *Archives of Internal Medicine*. – 2007. – Vol. 167, № 14. – P. 1476-1486.
240. Phillips A.M. Overview of the fracture healing cascade / A.M. Phillips // *Injury*. – 2005. – Vol. 36. – P. 5-7.
241. Physical and Histological Comparison of Hydroxyapatite, Carbonate Apatite, and β -Tricalcium Phosphate Bone Substitutes / K. Ishikawa, Y. Miyamoto, A. Tsuchiya [et al.] // *Materials*. – 2018. – Vol. 11, № 10. – P. 1993.
242. Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding

- protein-1 / Q. Chen, P. Sivakumar, C. Barley [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282, № 36. – P. 26418-26430.
243. Potential-Responsive Surfaces for Manipulation of Cell Adhesion, Release, and Differentiation / L. Zhang, Z. Wang, J. Das [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2019. – Vol. 58, № 41. – P. 14519-14523.
244. Prevention of Venous Thromboembolism in 2020 and Beyond / M. Nicholson, N. Chan, V. Bhagirath [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9, № 8. – P. 2467.
245. Puleo D.A. Understanding and controlling the bone-implant interface / D.A. Puleo, A. Nanci // *Biomaterials*. – 1999. – Vol. 20, № 23-24. – P. 2311-2321.
246. Ratushnyy A. Expansion of adipose tissue-derived stromal cells at ‘physiologic’ hypoxia attenuates replicative senescence / A. Ratushnyy, M. Lobanova, L.B. Buravkova // *Cell Biochemistry and Function*. – 2017. – Vol. 35, № 4. – P. 232-243.
247. Riddle R.C. Bone Cell Bioenergetics and Skeletal Energy Homeostasis / R.C. Riddle, T.L. Clemens // *Physiological Reviews*. – 2017. – Vol. 97, № 2. – P. 667-698.
248. Rider C.C. Heparin, Heparan Sulphate and the TGF- β Cytokine Superfamily / C.C. Rider, B. Mulloy // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 5. – P. 713.
249. Role of reactive oxygen species in mast cell degranulation / M.A. Chelombitko, A.V. Fedorov, O.P. Ilyinskaya [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – Vol. 81. – № 12. – P. 1564-1577.
250. Role of the Interaction of Tumor Necrosis Factor- α and Tumor Necrosis Factor Receptors 1 and 2 in Bone-Related Cells / H. Kitaura, A. Marahleh, F. Otori [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 3. – P. 1481.
251. Rosenberg R.D. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor / R.D. Rosenberg, P.S. Damus // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1973. – Vol. 248, № 18. – P. 6490-6505.
252. Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex / C. Banerjee, L.R. McCabe, J.Y. Choi [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 1997. – Vol. 66, № 1. – P. 1-8.
253. Schaper F. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade / F. Schaper, S. Rose-John // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2015. – Vol. 26, № 5. – P. 475-487.

254. Seeman E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength / E. Seeman // *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. – 2008. – Vol. 26, № 1. – P. 1-8.
255. Sequentially-crosslinked biomimetic bioactive glass/gelatin methacryloyl composites hydrogels for bone regeneration / J. Zheng, F. Zhao, W. Zhang [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* - 2018. – Vol. 89. – P. 119–127.
256. Shp2 Deletion in Hepatocytes Suppresses Hepatocarcinogenesis Driven by Oncogenic β -Catenin, PIK3CA and MET / J.J. Liu, Y. Li, W.S. Chen [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2018b. – Vol. 69, № 1. – P. 79-88.
257. Sims N.A. Influences of the IL-6 cytokine family on bone structure and function / N.A. Sims // *Cytokine*. – 2021. – Vol. 146. – P. 155655.
258. Statins, fenofibrate, and quinapril increase clot permeability and enhance fibrinolysis in patients with coronary artery disease / A. Undas, M. Celinska-Löwenhoff, T. Löwenhoff [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2006. – Vol. 4, № 5. – P. 1029-1036.
259. Steinemann S.G. Titanium--the material of choice? / S.G. Steinemann // *Periodontology 2000*. – 1998. – Vol. 17. – P. 7-21.
260. Stem cell factor supports migration in canine mesenchymal stem cells / N. Enciso, L.L.K. Ostronoff, G. Mejías [et al.] // *Veterinary Research Communications*. – 2018. – Vol. 42, № 1. – P. 29-38.
261. Stromal cell-derived factor-1 promotes human adipose tissue-derived stem cell survival and chronic wound healing / Q. LI, Y. Guo, F. Chen [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2016. – Vol. 12, № 1. – P. 45-50.
262. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) / P. Bourin, B.A. Bunnell, L. Casteilla [et al.] // *Cytotherapy*. – 2013. – Vol. 15, № 6. – P. 641-648.
263. Sulfated Polysaccharides Enhance the Biological Activities of Bone Morphogenetic Proteins / T. Takada, T. Katagiri, M. Ifuku [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 44. – P. 43229-43235.

264. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration / L. Le Guéhenec, A. Soueidan, P. Layrolle [et al.] // *Dental Materials*. – 2007. – Vol. 23, № 7. – P. 844-854.
265. Synergism between Wnt3a and Heparin Enhances Osteogenesis via a Phosphoinositide 3-Kinase/Akt/RUNX2 Pathway / L. Ling, C. Dombrowski, K.M. Foong [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285, № 34. – P. 26233-26244.
266. Synergistic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Bone Morphogenetic Proteins Induced Bone Formation In Vivo: Influencing Factors and Future Research Directions / B. Li, H. Wang, G. Qiu [et al.] // *BioMed Research International*. – 2016. – Vol. 2016. – 11 p.
267. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects / X.-M. Dai, G.R. Ryan, A.J. Hapel [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 99, № 1. – P. 111-120.
268. The Auxiliary Role of Heparin in Bone Regeneration and its Application in Bone Substitute Materials / J. Wang, L. Xiao, W. Wang [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 10. – 23 p.
269. The binding of heparin to spike glycoprotein inhibits SARS-CoV-2 infection by three mechanisms / G. Paiardi, S. Richter, P. Oreste [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 298, № 2. – 26 p.
270. The Choice of Anticoagulant Influences the Characteristics of Bone Marrow Aspirate Concentrate and Mesenchymal Stem Cell Bioactivity In Vitro / R.C. Dregalla, J.A. Herrera, L.S. Koldewyn [et al.] // *Stem Cells International*. – 2022. – Vol. 2022. – P. 1-12.
271. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing / P. Kolar, K. Schmidt-Bleek, H. Schell [et al.] // *Tissue Engineering. Part B, Reviews*. – 2010. – Vol. 16, № 4. – P. 427-434.
272. The influence of M-CSF on fracture healing in a mouse model / J. Starlinger, K. Sarahrudi, M. Kecht [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – 10 p.
273. The influence of the ceramic phase on the porosity of some biocomposites with collagen matrix used as bone substitutes / M.D. Vrânceanu, I. Antoniac, F. Miculescu [et

- al.] // *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*. – 2012. – Vol. 14, № July-August 2012. – P. 671-677.
274. The Monocyte Chemotactic Protein-1 — Interleukin-6 — Osteopontin Pathway of Intra-Aneurysmal Tissue Healing / K. Hosaka, K. Rojas, H.Z. Fazal [et al.] // *Stroke*. – 2017. – Vol. 48, № 4. – P. 1052-1060.
275. The plasma levels and diagnostic utility of stem cell factor (SCF) and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) in cervical cancer patients / S. Lawicki, E. Bedkowska, E. Gacuta-Szumarska [et al.] // *Polski Merkurusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. – 2008. – Vol. 25, № 145. – P. 38-42.
276. The Role of Osteoprotegerin and Its Ligands in Vascular Function / L. Rochette, A. Meloux, E. Rigal [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 705.
277. Theman T.A. The role of the calcium-sensing receptor in bone biology and pathophysiology / T.A. Theman, M.T. Collins // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2009. – Vol. 10, № 3. – P. 289-301.
278. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects / J.R. Perez, D. Kouroupis, D.J. Li [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 6. – P. 105.
279. Tomida M. The human hepatocyte growth factor (HGF) gene is transcriptionally activated by leukemia inhibitory factor through the Stat binding element / M. Tomida, T. Saito // *Oncogene*. – 2004. – Vol. 23, № 3. – P. 679-686.
280. Trail (TNF-related apoptosis-inducing ligand) induces an inflammatory response in human adipocytes / V. Zoller, J. Funcke, J. Roos [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 5691.
281. TRAIL inhibits angiogenesis stimulated by VEGF expression in human glioblastoma cells / G. Cantarella, N. Risuglia, R. Dell'eva [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2006. – Vol. 94, № 10. – P. 1428-1435.
282. TRAIL inhibits RANK signaling and suppresses osteoclast activation via inhibiting lipid raft assembly and TRAF6 recruitment / H. Liao, H. Tsai, C. Wu [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2019. – Vol. 10. – P. 77.

283. Tumor necrosis factor-alpha induces activation of coagulation and fibrinolysis in baboons through an exclusive effect on the p55 receptor / T. van der Poll, P. M. Jansen, K. J. Van Zee [et al.] // *Blood*. – 1996. – Vol. 88, № 3. – P. 922-927.
284. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family / C.V. Pecot, R. Rupaimoole, D. Yang [et al.] // *Nature communications*. – 2013. – Vol. 4. – P. 2427.
285. Uccelli A. Mesenchymal stem cells in health and disease / A. Uccelli, L. Moretta, V. Pistoia // *Nature Reviews. Immunology*. – 2008. – Vol. 8, № 9. – P. 726-736.
286. Ullah I. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective / I. Ullah, R.B. Subbarao, G.J. Rho // *Bioscience Reports*. – 2015. – Vol. 35, № 2. – P. e00191.
287. Utilizing Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and β -Tricalcium Phosphate Scaffold in Human Bone Defects: A Prospective, Controlled Feasibility Trial / P. Šponer, S. Filip, T. Kučera [et al.] // *BioMed Research International*. – 2016. – Vol. 2016. – 12 p.
288. Vande Vondele S. RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion / S. Vande Vondele, J. Vörös, J.A. Hubbell // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2003. – Vol. 82, № 7. – P. 784-790.
289. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms / Q. Ge, H. Zhang, J. Hou [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 1667-1675.
290. Von Andrian U.H. A massage for the journey: Keeping leukocytes soft and silent / U.H. von Andrian // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94, № 10. – P. 4825-4827.
291. Walton B.L. Fibrinogen, red blood cells, and factor XIII in venous thrombosis / B.L. Walton, J.R. Byrnes, A.S. Wolberg // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 208-215.
292. Wang K. The use of titanium for medical applications in the USA: International Symposium on Metallurgy and Technology of Titanium Alloys / K. Wang // *Materials Science and Engineering: A*. – 1996. – Vol. 213, № 1. – P. 134-137.

293. Watt F.M. Out of Eden: stem cells and their niches / F.M. Watt, B.L. Hogan // Science (New York, N.Y.). – 2000. – Vol. 287, № 5457. – P. 1427-1430.
294. Weitz D.S. Update on heparin: what do we need to know? / D.S. Weitz, J.I. Weitz // Journal of Thrombosis and Thrombolysis. – 2010. – Vol. 29, № 2. – P. 199-207.
295. Wendelboe A.M. Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects / A.M. Wendelboe, G.E. Raskob // Circulation Research. – 2016. – Vol. 118, № 9. – P. 1340-1347.
296. Wennerberg A. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide / A. Wennerberg, T. Albrektsson, B. Andersson // The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. – 1996. – Vol. 11, № 1. – P. 38-45.
297. Wennerberg A. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions / A. Wennerberg, T. Albrektsson // The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. – 2010. – Vol. 25, № 1. – P. 63-74.
298. Yang L. Heparin Inhibits the Expression of Interleukin-11 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Primate Bone Marrow Stromal Fibroblasts Through mRNA Destabilization / L. Yang, Y.-C. Yang // Blood. – 1995. – Vol. 86, № 7. – P. 2526-2533.
299. Yang Y.C. Interleukin-3: molecular biology and biologic activities / Y.C. Yang, S.C. Clark // Hematology/Oncology Clinics of North America. – 1989. – Vol. 3, № 3. – P. 441-452.
300. Yao C. Anodization: a promising nano-modification technique of titanium implants for orthopedic applications / C. Yao, T.J. Webster // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2006. – Vol. 6, № 9. – P. 2682-2692.
301. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease / M. Zaidi // Nat. Med. – 2007. – Vol. 13, № 7. – P. 791–801.
302. Zehnder J.L. Mast-cell heparin demystified / J.L. Zehnder, S.J. Galli // Nature. – 1999. – Vol. 400, № 6746. – P. 714-715.
303. Zhang X. Activated Monocyte-derived TNF- α Upregulates HGF/c-Met to Trigger EMT of Hepatoma Cells / X. Zhang // Proceedings of the 2020 12th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology: ICBBT 2020. – 2020. – P. 127-133.