

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-53-71>



Изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК-ЖТ при *in vitro* сокультивировании с гепарином

К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, В.В. Малащенко, О.Б. Мелашенко, И.А. Хлусов, Д.Д. Лигатюк, П.А. Иванов, Л.С. Литвинова

Центр иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. И. Канта, 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, 6, Россия

Адрес для корреспонденции: larisalitvinova@yandex.ru

Аннотация

Цель данного исследования — изучение влияния гепарина в концентрации 1 МЕ/мл на изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК жировой ткани человека в условиях сокультивирования *in vitro*.

Материалы и методы. Оценка фенотипического профиля культуры МСК жировой ткани человека при культивировании в присутствии/отсутствии гепарина проводилась с помощью метода проточной цитометрии с использованием соответствующих красителей согласно протоколу фирмы-производителя на проточном цитофлуориметре MACS Quant после 14-суточного культивирования. Для оценки миграционного и пролиферативного потенциала МСК в присутствии гепарина использовалась электродная система непрерывного наблюдения — xCELLigence® RTCA DP. После 14-суточного культивирования МСК с гепарином производилась оценка внутриклеточной экспрессии генов остеодифференцировки методом ПЦР в реальном времени; кроме того, производилась оценка дифференцировочного профиля МСК жировой ткани человека при сокультивировании с гепарином методом цитологического окрашивания ализариновым красным с целью обнаружения островков минерализации спустя 21 сутки культивирования. Также в супернатантах 14-дневных культур оценивалось количество ростовых факторов, хемокинов, молекул с про- и противовоспалительной активностью.

Результаты. Выявлено достоверное снижение (относительно контрольной группы исследования) количества клеток, несущих на клеточной поверхности маркеры МСК (CD73, CD90, CD105) культуры в модели МСК + гепарин; повышение пролиферативной и снижение миграционной активности МСК при сокультивировании с гепарином; повышение уровней относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*) и клеточной адгезии (*CD49d*); увеличение площади минерализации в модели исследования в присутствии гепарина после 21-суточного культивирования. Отмечена тенденция к увеличению секреции ростового фактора VEGF и провоспалительного фактора IL-6 в модели МСК + гепарин.

Заключение. Полученные результаты могут служить базисом для разработки новых терапевтических тактик ведения пациентов хирургического профиля при операциях остеосинтеза с высоким риском тромбообразования.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, гепарин, миграция, стволовость, остеодифференцировка, имплантат, *in vitro*

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Мелашенко О.Б., Хлусов И.А., Лигатюк Д.Д., Иванов П.А., Литвинова Л.С. Изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК-ЖТ при *in vitro* сокультивировании с гепарином. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(1):53–71. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-53-71>

Поступила: 30.05.2023

Обработана: 18.07.2023

Принята: 21.08.2023

Changes of osteodifferentiation potential of MSC-AT during *in vitro* co-cultivation with heparin

Kristina A. Yurova, Olga G. Khaziahmatova, Vladimir V. Malashchenko, Olga B. Melashchenko, Igor A. Khlusov, Denis D. Ligatyuk, Pavel A. Ivanov, Larisa S. Litvinova

Center of Immunology and Cellular Biotechnology of I. Kant Baltic Federal University, 236001, Kaliningrad, str. Gaidara, 6, Russia

Correspondence address: larisalitvinova@yandex.ru

Abstract

The **aim** of this study was to investigate the effect of heparin at a concentration of 1 IU/mL on changes in the osteodifferentiation potential of MSC from human adipose tissue under *in vitro* cocultivation.

Materials and methods. Assessment of the phenotypic profile of MSC from human adipose tissue during cultivation in the presence/absence of heparin was performed by the flow cytometry method using the appropriate dyes according to the manufacturer's protocol on a MACS Quant flow cytometer after 14 days of cultivation. To evaluate the migration and proliferation potential of MSCs in the presence of heparin, we were using a continuous monitoring electrode system, xCELLigence® RTCA DP. After cultivation MSCs with heparin for 14 days, the intracellular expression of osteodifferentiation genes was evaluated by real-time PCR. In addition, the differentiation profile of MSCs from human adipose tissue cultured with heparin was evaluated by cytological staining with alizarin red to detect islands of mineralization after 21 days of cultivation. In addition, the amount of growth factors, chemokines, molecules with pro- and antiinflammatory activity was estimated in the supernatants of the 14-day cultures.

Results. There was a significant decrease (compared with the control group of the study) in the number of cells with stem markers (CD73, CD90, CD105) on the cell surface of the culture in the MSC + heparin model; increase in proliferative and decrease in migratory activity of MSCs during co-cultivation with heparin; increased levels of relative mRNA expression of genes for osteodifferentiation (ALPL, RUNX2, BMP2, BMP6) and cell adhesion (CD49d); increase in mineralization area in the study model in the presence of heparin after 21 days of cultivation. There was a tendency to increase secretion of growth factor VEGF and pro-inflammatory factor IL -6 in the MSC + heparin model.

Conclusion. The obtained results may serve as a basis for the development of new therapeutic tactics for the treatment of surgical patients undergoing osteosynthesis operations with a high risk of thrombosis.

Keywords: mesenchymal stem cells, heparin, migration, stemness, osteodifferentiation, implant, *in vitro*

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Yurova K.A., Khaziahmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Khlusov I.A., Ligatyuk D.D., Ivanov P.A. 1, Litvinova L.S. Changes of osteodifferentiation potential of MSC-AT during *in vitro* co-cultivation with heparin. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(1):53–71. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-53-71>

Received 30.05.2023

Revised 18.07.2023

Accepted 21.08.2023

Список сокращений:

- ЖТ — жировая ткань
ИКМ — индекс клеточной миграции
ИКП — индекс клеточной пролиферации
МСК — мезенхимальные стволовые клетки
ППС — полная питательная среда
ALPL (от англ. alkaline phosphatase) — щелочная фосфатаза
BMP (от англ. bone morphogenetic protein) — костный морфогенетический белок
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-1 α (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

В регенеративной медицине репарация костных дефектов зачастую осуществляется посредством имплантации искусственных материалов, имитирующих топографию поверхности костной ткани. Контакт костнозамещающего имплантата и тканей реципиента индуцирует развитие воспалительной реакции после проведения хирургических операций остеосинтеза или ремоделирования костей. Развитие локального острого неинфекционного воспалительного процесса — необходимый этап для более эффективного ремоделирования повреждений костных тканей [1].

Имплантация материала при контакте с тканями реципиента сопровождается осаждением на поверхности имплантата слоя белков крови и интерстициальной жидкости. Адсорбированные белки, в свою очередь, активируют систему комплемента, компоненты врожденного иммунитета, что способствует инициации коагуляционного гемостаза, приводящее к образованию сгустка фибрина на поверхности материала [2]. Внеклеточный матрикс, обра-

зовавшийся на поверхности материала, состоит из молекул фибрина, коллагена и эластина, что служит базисом для формирования новой тканевой структуры посредством миграции и адгезии к образованному сгустку стволовых клеток, что, в конечном счете, приводит к формированию костного регенерата. Таким образом, происходит образование стабильной связи между костной тканью реципиента и поверхностью имплантата с его дальнейшей остеоинтеграцией [3].

Однако существуют патологические состояния, характеризующиеся нарушением системы гемостаза и гиперкоагуляцией, которые часто наблюдаются у пациентов хирургического профиля. Для предотвращения развития послеоперационных патологических состояний, вызванных гиперкоагуляционным синдромом (например, тромбообразование, тромбоэмболии крупных артерий, инфаркт и т.п.), используют терапевтические стратегии с применением антитромботических или антикоагулянтных лекарственных препаратов (например, аспирин, клопидогрель, гепарин, варфарин и другие) [1].

Тем не менее использование прямых антикоагулянтов, в частности гепарина, способствует ограничению нормального формирования фибринового сгустка *in situ* на поверхности имплантата, тем самым ингибируя миграцию и адгезию мезенхимальных стволовых клеток (МСК) к образовавшейся костной мозоли, что, в целом, нарушает процессы остеоинтеграции имплантатов и ремоделирования костной ткани. Также весьма противоречивы современные данные о влиянии гепарина на остеодифференцировочный профиль культуры МСК. L. Ling и коллеги (2010) продемонстрировали, что гепарин активирует Wnt-сигнальный путь за счет взаимодействия с Wnt3a, увеличивая тем самым остеодифференцировку МСК [4]. В другом исследовании было показано ингибирование гепарином BMP6-индуцированного образования новых костей и хрящей на модели крыс [5].

Таким образом, **целью** данного исследования стало изучение влияния гепарина в концентрации 1 МЕ/мл на изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК жировой ткани человека в условиях сокультивирования *in vitro*.

Материалы и методы

МСК получали из липоаспирата жировой ткани человека (Разрешение № 1 от 28.02.2019 локального этического комитета Инновационного парка БФУ имени И. Канта). Выделенная культура соответствовала всем минимальным критериям, предъявляемым к этой культуре: способность клеток к адгезии на поверхности культурального пластика; положительная экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD73 и CD90 в сочетании с минимальной (до 2%) экспрессией маркеров CD45/CD34; способность к дифференцировке в мезодермальном направлении (остео-, хондро- и адипогенное) [6].

Нами было предварительно протестировано воздействие на морфофункциональное состояние МСК жировой ткани человека следующих 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 МСК 1 МЕ/мл (8 мкг/мл) гепарина; данная концентрация была в дальнейшем использована в настоящем *in vitro* исследовании.

Двумерная (2D) модель культивирования на пластике без гепарина служила контролем для оценки морфофункционального состояния клеток, сокультивируемых с гепарином («Белмедпрепараты», Беларусь) в концентрации 1 МЕ/мл — «МСК + гепарин».

Для оценки морфофункциональных реакций клеток в присутствии гепарина МСК культивировали в 12-луночных стерильных пластиковых культуральных плоскодонных планшетах («Orange Scientific», Бельгия). МСК культивировали (1×10^5 кл/мл) в 2 мл полной питательной среды (ППС) следующего состава: 90% DMEM/F12 (1:1) («Gibco Life Technologies», США), 10% FBS («Sigma Aldrich», США), 50 мг/л гентамицина («Invitrogen», Великобритания), 280 мг/л L-глутамина («Sigma Aldrich», США). Сроки культивирования составили 92 часа, 14 дней и 21 день при температуре 37 °C, 100% влажности в атмосфере 5% CO₂. Смена питательной среды производилась каждые 3–4 суток.

Оценка жизнеспособности исследуемых клеточных культур и подсчет общего числа клеток до и после культивирования производились с использованием слайдов на автоматическом счетчике клеток Countess TM Automated Cell Counter (Invitrogen, США). 5 мкл клеточной суспензии смешивали с 5 мкл раствора 0,4% трипанового синего. В исследовании использовали культуры МСК жировой ткани человека с жизнеспособностью не менее 90%.

Определение фенотипического профиля МСК проводили методом проточной цитометрии с использованием MSC Phenotyping Kit human — 130-095-198 («MiltenyiBiotec», США) согласно протоколу фирмы-производителя на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия). Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США).

Миграционную и пролиферативную активности МСК оценивали с использованием электродной системы для непрерывного наблюдения (real-time cell analysis) — xCELLigence® RTCA DP («ACEA Biosciences Inc.», США), сравнивая результаты исследования контрольной группы клеток без гепарина с экспериментальной группой исследования клеточной культуры с добавлением гепарина в концентрации

1 МЕ/мл. СИМ-планшет — 16-луночный планшет, представляющий систему из 2 полостей, разделенных мембраной. В верхние микролунки планшета (максимальный объем 180 мкл) помещали МСК (2×10^4 кл/мл) с гепарином/без гепарина. Обратная сторона мембраны, разделяющая микролунки, на 80% покрыта ячейками из золотых электродов. Данные, основанные на полученном импедансе, снятом с электродов, демонстрируют площадь, занятую клетками в указанный промежуток времени. Площадь, занятая клетками, напрямую зависит от скорости их миграции (инвазии) через микропоры СИМ-планшета диаметром 8 мкм. Это позволяет отслеживать миграционную активность в определенный промежуток времени. Результаты измерений представлены в виде индекса клеточной миграции (ИКМ). Сигналы для определения ИКМ с помощью программного обеспечения RTCA Software фиксировали каждые 15 минут в течение 92 часов.

Для оценки пролиферативной активности МСК использовали 16-луночный Е-планшет. За счет контакта исследуемых клеточных культур с электродами, расположенными на дне лунки планшета, осуществляется детекция клеточного импеданса (индекса клеточной пролиферации — ИКП). Величина ИКП зависит от количества клеток, их формы и размера, а также от качества прикрепления клеток к субстрату Е-планшета.

Оценка уровня относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*) и гена-субъединицы интегрина *VLA-4* (*CD49d*) проводилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени после 14 суток культивирования. Из полученных нами образцов выделяли тотальную РНК с использованием реагента Extract RNA kit («Евроген», Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Далее проводилась реакция обратной транскрипции с целью получения ДНК-матриц с использованием реакционной смеси, содержащей фермент ревертазу, РНК-матрицу и праймеры oligo(dT)23-primer («Beagle», Россия). Определение уровня относительной экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя реагенты qPCRMixHS («Евроген», Россия) и специфические зонды TaqMan и праймеры (10 пМ) («Beagle», Россия). Уровни относительной экспрессии мРНК для каждого исследуемого гена рассчитывали с использованием модифицированной формулы Пфаффа.

Оценку концентрации исследуемых ростовых факторов (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, VEGF), хемокинов (SDF-1 α , MCP-1, IL-8) и молекул с про- и противовоспалительной активностью (TNF- α , IL-6, TRAIL) осуществляли в супернатантах 14-дневных клеточных культур МСК. Анализ проводился методом проточной флуориметрии с применением коммерческих тест-систем (Bio-Plex Pro Human Cytokine 48-plex Assay, «Bio-Rad», США) и программного обеспечения BioPlex-Manager («Bio-Rad», США) на двухлучевом лазерном автоматическом анализаторе (Bio-Plex[®] 200 Systems, «Bio-Rad», США) согласно протоколу фирмы-производителя. Отобранные супернатанты центрифугировали при 500 об/мин в течение 10 минут (при 4 °С) для получения фракции биологически активных молекул. Далее определяли концентрацию биологически активных молекул по стандартной кривой применяемого набора (определяемый диапазон составлял 2–32 000 пг/мл) согласно инструкции производителя. Нижняя граница чувствительности метода составила <2 пг/мл. Концентрация исследуемых факторов, значения которых было ниже порога чувствительности методики, приравнивалась к 1 пг/мл.

Оценка остеодифференцировочного потенциала под влиянием гепарина проводилась методом цитологического окрашивания ализариновым красным после 21-суточного культивирования культур МСК в присутствии/отсутствии гепарина. По истечении 21 дня культивирования исследуемые культуры дважды отмывали фосфатным солевым буфером. Адгезированные клетки оставляли сушиться на воздухе, затем фиксировали в парах формалина и окрашивали 2% водным раствором ализаринового красного S (Sigma-Aldrich, США) для оценки минерализации межклеточного матрикса согласно инструкции фирмы-производителя. Негативным контролем дифференцировки служила двумерная 2D контрольная культура МСК в стандартной ППС, не контактировавшая с гепарином в течение всего срока культивирования (21 сутки). Фотографии окрашенных ализариновым красным культур получали с использованием программного обеспечения («Olympus Corporation», Филиппины) на лабораторном биологическом микроскопе для фазового контраста и документирования IX 51 S8F. Морфометрическое исследование окрашенных культур МСК проводили с использованием программного обеспечения Image-J Software (National Institutes of Health, США) согласно

алгоритму, представленному в руководстве [7]. Очаги минерализации межклеточного матрикса на микрофотографиях выделяли с помощью инструмента «Treshold». Для каждой микрофотографии индивидуально подбирался допуск инструмента согласно цветовой характеристике минерализата. После проведения измерений площадь общей минерализации всех микрофотографий ($\text{мм}^2/\text{см}^2$) заносили в таблицу для проведения дальнейшего статистического анализа.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью методов статистического описания, методов проверки гипотез. Проверка выборки на нормальность распределения проводили с использованием критерия Колмогорова — Смирнова. Данные не подчинялись нормальному закону распределения, в связи с чем для описательной статистики определяли медиану (M), 25%-ный (Q_1) и 75%-ный (Q_3) квартили. Статистическую значимость различий между исследуемыми группами проверяли с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни для независимых выборок. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Статистический анализ результатов был проведен с использованием пакета программ Graph Pad Prism version 8.0.1 (Graph Pad Software Inc, США).

Результаты

Оценка жизнеспособности МСК

Оценка жизнеспособности клеточных культур была произведена по истечении 14 суток культивирования во всех группах исследования (табл. 1).

Количество живых клеток в контрольной группе 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 (табл. 1).

Анализ фенотипического профиля МСК

По истечении срока культивирования (14 суток) доля клеток, экспрессирующих маркеры кроветворных клеток [CD45, 34, 14, 20]+ в контрольной группе составила 0,41 (0,17–0,52)% (табл. 2). Значимых различий по изменению числа клеток с фенотипом гемопоэтических среди исследуемых групп обнаружено не было. В экспериментальной модели с гепарином регистрировалось достоверное умень-

Таблица 1. Процентное содержание живых и мертвых форм мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина (1 МЕ/мл), Me (Q_1 – Q_3)

Группы исследования	Количество живых клеток, %	Количество апоптотических клеток, %	Количество мертвых клеток, %
Контрольная группа $n = 6$	94,93 (93,76–95,07)	3,17 (3,01–4,95)	1,81 (1,29–1,96)
МСК + гепарин $n = 6$	92,69 (92,13–94,29)	5,53 (4,65–5,85)	1,79 (1,07–2,03)

Примечание: $p_0 < 0,05$ — достоверные различия с контрольной группой; n — кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

Таблица 2. Анализ фенотипического состава культур мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина, Me (Q_1 – Q_3) (срок культивирования — 14 дней)

Группы исследования	[CD90]*	[CD105]*	[CD73]*	[CD45, 34, 14, 20]*
Контрольная группа $n = 6$	92,83 (92,02–93,94)	91,52 (91,21 – 92,42)	84,89 (83,84–85,99)	0,41 (0,17–0,52)
МСК + гепарин $n = 6$	81,26 (79,64–85,62) $p_0 < 0,05$	80,31 (80,11–82,73) $p_0 < 0,05$	71,51 (68,74–72,81) $p_0 < 0,05$	0,45 (0,28–0,67)

Примечание: $p_0 < 0,05$ — достоверные различия с контрольной группой; n — кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

шение доли клеток, экспрессирующих на своей поверхности маркеры МСК CD90, CD105 и CD73, относительно значений, полученных в контрольной группе ($p < 0,05$).

Оценка миграционной активности МСК

Результаты миграционной активности МСК в присутствии/отсутствии гепарина представлены на рисунке 1 и в таблице 3. График представляет собой логарифмическую кривую, которая демонстрирует динамику миграционной (инвазивной) активности культуры МСК через пористую мембрану двухуровневого СИМ-планшета. Кривые, отражающие динамику миграционной (инвазивной) активности клеточной культуры через пористую мембрану СИМ-планшета, были автоматически построены с помощью системы xCELLigence и могут быть разделены на две фазы: Фаза 1 (0–8 часов) — фаза линейного роста; Фаза 2 (8–92 часа) — фаза логарифмического роста с постепенным увеличением показателя ИКМ. Выход логарифмической кривой на плато произошел через 8 часов после начала эксперимента. Резкое повышение ИКМ первой фазы может быть объяснено инвазией клеточных культур МСК из верхней камеры СИМ-планшета в его нижнюю камеру через микропоры мембраны, что является имитацией миграции подвижных клеток из кровеносного русла в ткани живого организма. Изменение показателей ИКМ во второй фазе может быть вызвано расплыванием клеток МСК на поверхности электродов.

Таблица 3. Индекс клеточной миграции мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 92 часа), Me (Q1–Q3)

Группы исследования	Индекс клеточной миграции, усл. ед.
Контрольная группа $n = 4$	2,16 (1,54–2,95)
МСК + гепарин $n = 4$	1,76 (1,64–1,79) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

Данные на рисунке 1, полученные с помощью системы RTCA, демонстрируют первоначальное резкое увеличение индекса клеточной миграции клеточных культур МСК во всех исследуемых группах в связи с высокой миграционной активностью клеток в течение первых 8 часов. По истечении 8 часов *in vitro* культивирования клеточность в нижней камере СИМ-планшета переходила в фазу логарифмического роста, что напрямую связано со снижением скорости прироста индекса клеточной миграции. ИКМ резко увеличился во всех группах исследования после добавления гепарина (1 МЕ/мл) в лунки планшета согласно дизайну эксперимента (спустя 22 часа от его начала). Затем происходило снижение ИКМ клеточных культур во всех

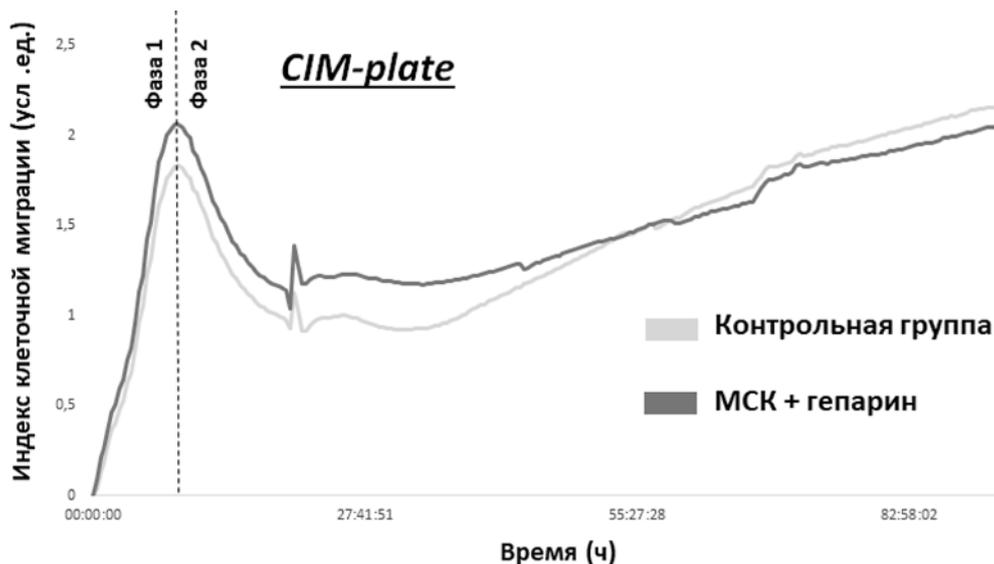


Рис. 1. Кривые миграционной (инвазивной) активности мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина в электродной системе RTCA (92-часовое наблюдение). Фаза 1 – фаза линейного роста; Фаза 2 – фаза логарифмического роста. * – статистически значимые различия между группами.

исследуемых группах, после чего наступала фаза логарифмического роста ИКМ (по истечении 30 часов от начала эксперимента).

Моделирование миграции и инвазии МСК с помощью системы RTCA при *in vitro* сокультивировании с гепарином позволило получить значимые результаты по прошествии 92 часов эксперимента (рис. 1). Присутствие гепарина статистически значимо снижало миграционную активность МСК относительно контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 3).

Анализ пролиферативной активности МСК

Результаты пролиферативной активности МСК в присутствии/отсутствии гепарина представлены на рисунке 2 и в таблице 4. На графике представлена логарифмическая кривая, описывающая динамику индекса клеточной пролиферации (ИКП) МСК, величина которого зависит от количества клеток, формы и размера клеток, а также от качества прикрепления клеток к субстрату 16-луночного E-планшета. Кривые, характеризующие динамику ИКП, автоматически построены системой xCELLigence, основываясь на полученных в указанный промежуток времени данных, и визуально разделяются на две фазы: Фаза 1 (0–8 часов) — фаза линейного роста; Фаза 2 (8–92 часа) — фаза логарифмического роста с постепенным увеличением показателя ИКП.

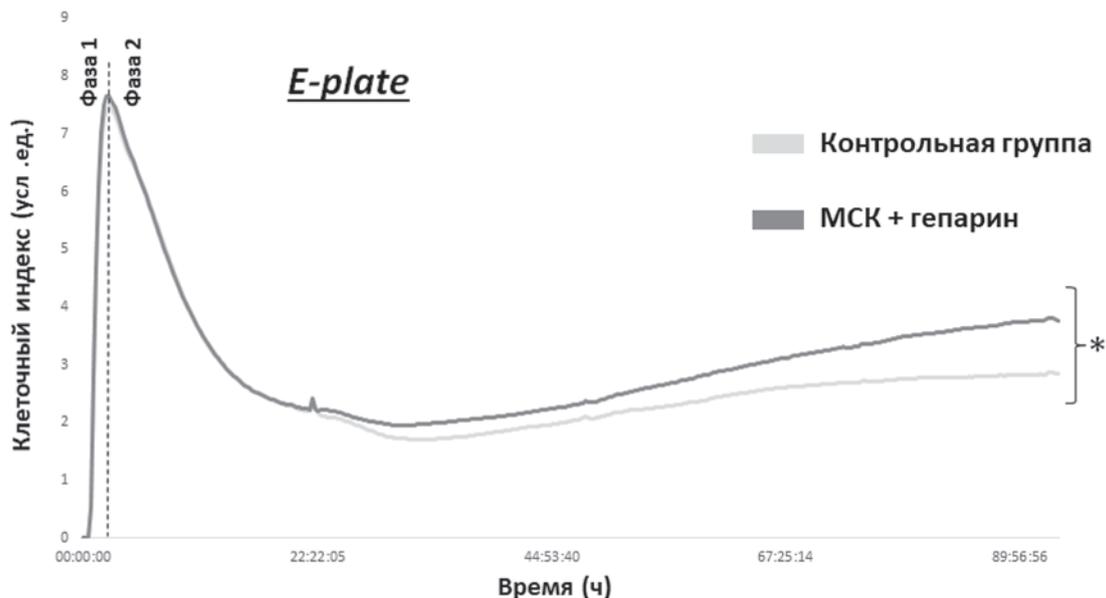


Рис. 2. Кривые клеточной пролиферации мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина в электродной системе RTCA (92-часовое наблюдение). Фаза 1 — фаза линейного роста; Фаза 2 — фаза логарифмического роста. * — статистически значимые различия между группами.

Таблица 4. Изменение индекса клеточной пролиферации (ИКП, усл. ед.) мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования — 92 часа), Ме (Q1–Q3)

Группы исследования	Индекс клеточной пролиферации, усл. ед.
Контрольная группа $n = 4$	2,85 (2,67–3,02)
МСК + гепарин $n = 4$	3,95 (3,92–3,98) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ — достоверные различия с контрольной группой; n — кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

Согласно полученным данным наивысший показатель индекса клеточной пролиферации во всех группах исследования наблюдался на третий час от начала эксперимента, что подтверждает успешную адгезию клеток к субстрату E-планшета (рис. 2). Затем, в период от 3 до 22 часов эксперимента, наблюдалось резкое снижение числа клеток в процессе активной пролиферации во всех исследуемых группах. Далее клетки начинали входить в фазу логарифмического роста.

В соответствии с дизайном эксперимента в лунки был добавлен гепарин в концентрации 1 МЕ/мл спустя 22 часа культивирования

от начала эксперимента. На момент окончания эксперимента (спустя 92 часа) ИКП культуры МСК в модели культивирования в присутствии гепарина оказался значимо выше в сравнении с контрольной моделью ($p < 0,05$) (рис. 2, табл. 4). Исходя из полученных данных добавление гепарина в культуру МСК оказывало модулирующее влияние на их способность к рас-пластыванию.

Оценка уровня относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки и клеточной адгезии

По истечении 14 суток культивирования было выявлено, что добавление в среду культивирования МСК гепарина способствовало достоверному увеличению уровня относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*RUNX2*, *ALPL*, *BMP2* и *BMP6*) и гена α -субъединицы интегрин VLA-4 (*CD49d*) (табл. 5).

Оценка уровня относительной экспрессии мРНК гена *RUNX2* выявила статистически значимое увеличение экспрессии данного гена в модели культивирования с гепарином (МСК + гепарин) относительно контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 5, рис. 3). Также нами получено статистически значимое повышение экспрессии мРНК гена *ALPL* в группе «МСК + гепарин» относительно контрольной группы исследования ($p < 0,05$) (табл. 5, рис. 3).

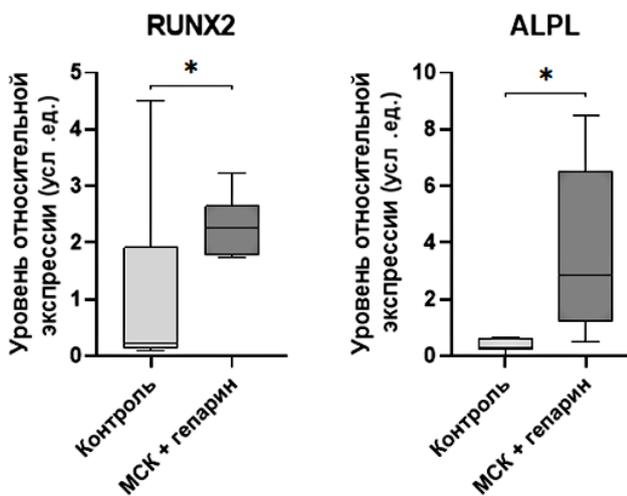


Рис. 3. Уровни относительной экспрессии (усл. ед.) мРНК генов *RUNX2* и *ALPL* в мезенхимальных стволовых клетках при *in vitro* сокультивировании в присутствии/отсутствии гепарина, срок культивирования – 14 суток. * – статистически значимые различия между группами

Таблица 5. Уровни относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки и клеточной адгезии в мезенхимальных стволовых клетках при сокультивировании *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 14 суток), Ме (Q1–Q3)

Определяемый ген, усл. ед.	Группы исследования	
	Контрольная группа $n = 6$	МСК + гепарин $n = 6$
<i>RUNX2</i>	1,09 (0,57–1,52)	2,41 (1,73–3,23) $p_0 < 0,05$
<i>ALPL</i>	0,37 (0,26–0,66)	6,23 (5,29–8,51) $p_0 < 0,05$
<i>BMP2</i>	0,94 (0,52–1,25)	4,05 (3,21–5,71) $p_0 < 0,05$
<i>BMP6</i>	0,37 (0,26–0,64)	2,08 (0,98–3,59) $p_0 < 0,05$
<i>CD49d</i>	0,43 (0,29–0,46)	4,89 (3,29–6,86) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

В группе «МСК + гепарин» был зарегистрирован достоверный рост относительного уровня экспрессии мРНК гена *BMP2* относительно значений, полученных при оценке контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 5, рис. 4). Похожие результаты

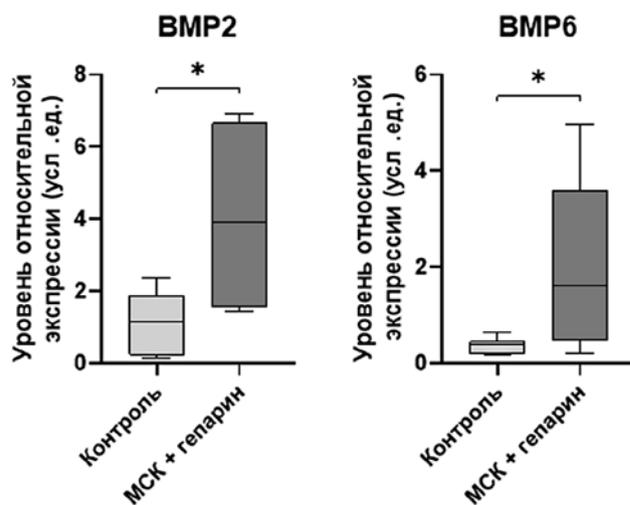


Рис. 4. Уровни относительной экспрессии (усл. ед.) мРНК генов *BMP2* и *BMP6* в мезенхимальных стволовых клетках при *in vitro* сокультивировании в присутствии/отсутствии гепарина, срок культивирования – 14 суток. * – статистически значимые различия между группами

были получены при анализе уровня относительной экспрессии мРНК гена *VMP6* (табл. 5, рис. 4).

Уровень экспрессии мРНК гена *CD49d* в группе «МСК + гепарин» превышал значения, полученные при оценке контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 5, рис. 5).

Анализ продукции ростовых факторов, хемокинов, провоспалительных цитокинов культурой МСК

Результаты, полученные методом мультиплексного анализа, представлены в таблицах 6 и 7. Согласно полученным данным в супернатантах 14-дневных культур МСК контрольной группы исследования нами было зафиксирована секреция культурой МСК не менее 40 факторов роста, хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов в данной модели исследования. Для более детального анализа из всего спектра продуцируемых цитокинов нами были выбраны ростовые факторы (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3,

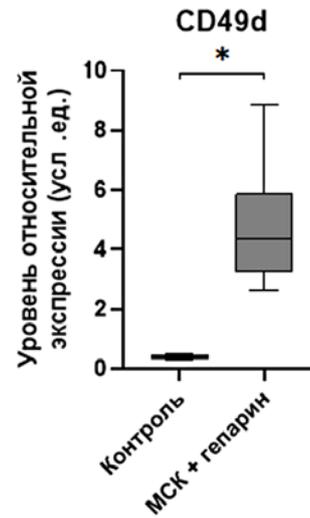


Рис. 5. Уровни относительной экспрессии гена *CD49d* в мезенхимальных стволовых клетках при *in vitro* сокультивировании в присутствии/отсутствии гепарина, срок культивирования – 14 суток. * – статистически значимые различия между группами

Таблица 6. Концентрация (пг/мл) ростовых факторов (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, VEGF) в супернатантах культур мезенхимальных стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 14 дней), Ме (Q1–Q3)

Исследуемые факторы, пг/мл		HGF	LIF	M-CSF	SCF	IL-3	VEGF
Группы исследования	Контрольная группа $n = 6$	35,62 (32,63–38,6)	19,05 (18,79–19,31)	5,04 (4,55–5,67)	5,94 (5,45–6,21)	0,21 (0,19–0,22)	120,04 (115,32–128,09)
	МСК + гепарин $n = 6$	8,59 (6,37–10,81) $p_0 < 0,05$	1,02 (0,92–1,29) $p_0 < 0,05$	1,23 (0,98–1,92) $p_0 < 0,05$	1,09 (1,05–1,21) $p_0 < 0,05$	0,00 (0,00–0,00) $p_0 < 0,05$	165,66 (154,21–172,23) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

Таблица 7. Концентрация (пг/мл) хемокинов (*SDF-1 α* , *MCP-1*, *IL-8*) и молекул с про- и противовоспалительной активностью (*TNF- α* , *IL-6*, *TRAIL*) в супернатантах культур мезенхимальных стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 14 дней), Ме (Q1–Q3)

Исследуемые факторы, пг/мл		<i>SDF-1α</i>	<i>MCP-1</i>	<i>IL-8</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-6</i>	<i>TRAIL</i>
Группы исследования	Контрольная группа $n = 6$	105,9 (103,8–118,1)	198,98 (182,13–201,11)	103,15 (69,23–115,23)	2,06 (1,80–3,31)	44,81 (38,15–47,23)	17,01 (15,04–19,02)
	МСК + гепарин $n = 6$	5,34 (3,28–6,40) $p_0 < 0,05$	23,82 (19,12–26,21) $p_0 < 0,05$	15,65 (14,11–25,34) $p_0 < 0,05$	0,94 (0,79–1,02) $p_0 < 0,05$	92,79 (87,13–98,22) $p_0 < 0,05$	2,42 (1,81–3,21) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

VEGF), хемокины (SDF-1 α , MCP-1, IL-8) и молекулы с про- и противовоспалительной активностью (TNF- α , TRAIL, IL-6).

Согласно полученным данным продукция ростового фактора HGF культурой МСК в группе «МСК + гепарин» была статистически значимо ниже значений, полученных при анализе контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 6). В присутствии гепарина в 2D-культуре наблюдалось снижение уровня ростового фактора LIF и M-CSF относительно контроля ($p < 0,05$). Похожие результаты были получены при анализе уровней ростового фактора SCF и IL-3: значимое снижение в группе «МСК + гепарин» относительно контрольной группы исследования ($p < 0,05$). Также нами были получены результаты, согласно которым в модели «МСК + гепарин» было задетектировано повышение концентрации VEGF относительно контрольной группы исследования ($p < 0,05$).

При сокультивировании МСК с гепарином наблюдалось статистически значимое уменьшение продукции хемокинового фактора SDF-1 α относительно контроля ($p < 0,05$) (табл. 7). Аналогичные результаты были получены при анализе хемокинового фактора MCP-1, цитокина IL-8, провоспалительного фактора TNF- α и провоспалительного/проапоптотического фактора TRAIL ($p < 0,05$) (табл. 7). Интересно, что в модели «МСК + гепарин» концентрация провоспалительного цитокина IL-6 превышала уровень значений в контрольной модели ($p < 0,05$).

Таблица 8. Суммарная площадь островков минерализации на дне лунки культурального пластика при окраске ализариновым красным в культурах мезенхимальных стволовых клеток, культивируемых *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 21 день), Me (Q1–Q3)

Группы исследования	Площадь островков минерализации, мм ² /см ²
Контрольная группа $n = 6$ $n_1 = 55$	0,0 (0,00–0,01)
МСК + гепарин $n = 6$ $n_1 = 100$	1,29 (0,92–1,35) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования; n_1 – число снимков для группы исследования.

Дифференцировочный потенциал культуры МСК

Для выявления способности культур МСК 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 (рис. 6).

Анализ результатов, полученных по истечении 21-суточного культивирования методом цитологического окрашивания, показал достоверное увеличение (в сравнении контрольной моделью) площади минерализации межклеточного вещества в группе «МСК + гепарин» ($p < 0,05$) (табл. 8).

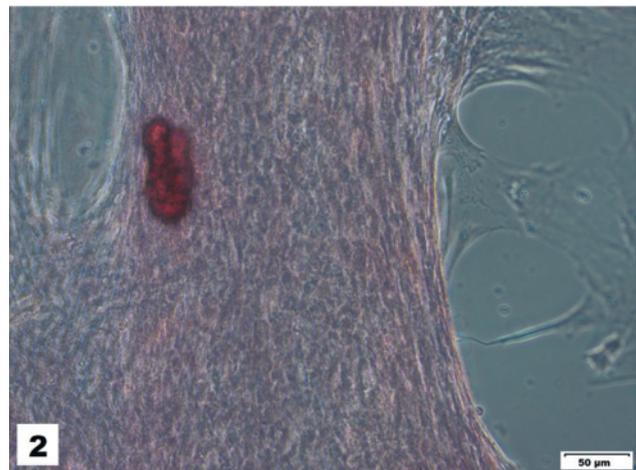
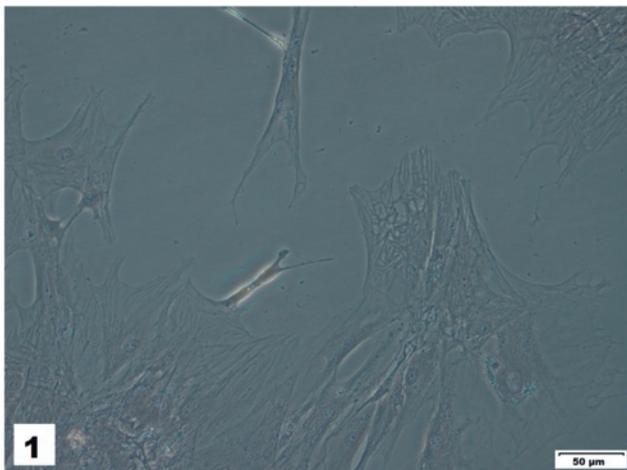


Рис. 6. Морфологическое состояние 21-суточной культуры МСК после сравнительного цитологического окрашивания ализариновым красным участков минерализации межклеточного вещества: 1 – контрольная группа, 2 – МСК + гепарин. Линейка в углу снимков соответствует 50 мкм

Таким образом, в условиях сокультивирования МСК с гепарином *in vitro* усиление минерализации межклеточного вещества может свидетельствовать о дифференцировке МСК в остеогенном направлении.

Обсуждение

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 [8]. В исследовании M. Simann 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 [8]. В отличие от этих результатов, другие авторы показали, что длительное культивирование МСК, полученных из костного мозга, с гепарином (в концентрации 160 нг/мл) практически не влияло на их дифференцировку в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях [9]. 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 преостеобластов [4].

Нами было выявлено, что *in vitro* сокультивирование (в течение 14 дней) МСК в разных условиях (с гепарином и без него) значимо не влияло на жизнеспособность клеточных культур — содержание живых клеток было сопоставимо с аналогичными значениями контрольной группы и варьировало в пределах 94% (табл. 1). Полученные нами результаты в отношении культур МСК, культивируемых с гепарином, в целом сопоставимы с данными исследования, проведенного Y. Li et al. (2016), демонстрирующего отсутствие влияния гепарина на жизнеспособность МСК жировой ткани *in vitro* [10].

Обнаруженное снижение экспрессии кластеров дифференцировки CD90, CD73 и CD105 на поверхности клеточной мембраны МСК в модели культивирования в присутствии гепарина может играть решающую роль в решение

судьбы клеточной культуры посредством модуляции дифференцировки в сторону остеобластов (табл. 2). Согласно данным литературы, CD90 высоко экспрессируется во всех типах МСК, что обусловлено недифференцированным статусом культуры [11]. В исследовании D.A. Moraes (2016) было показано, что снижение уровня экспрессии CD90 усиливает дифференцировку МСК в остеогенном и адипогенном направлениях [12].

Отсутствие/снижение экспрессии эндоглина (CD105) на поверхности МСК идентифицирует данную культуру клеток как более восприимчивую к остеогенной дифференцировке [13]. Сообщалось о прогрессирующей со временем потере экспрессии CD105 на поверхности клеток во время культивирования МСК, полученных как из мыши, так и из человека, что в очередной раз подтверждает участие данного рецептора в поддержании стволового состояния культуры МСК [14].

CD73, наряду с CD90 и CD105, является одним из классических маркеров, которые специфически определяют и подтверждают популяцию МСК [15]. K. Kimura et al. (2021) сообщают, что МСК с положительной экспрессией CD73 на своей поверхности демонстрируют повышенную стволовость и потенциал к остеогенной дифференцировке *in vitro* и *in vivo* [16].

Резюмируя вышесказанное: можно отметить, что полученные нами данные о снижении числа клеток, экспрессирующих поверхностные дифференцировочные маркеры МСК (CD90, CD105, CD73), могут свидетельствовать об утрате стволового состояния культуры МСК и приобретении ею состояния, более восприимчивого к дифференцировке в остеогенном направлении.

Использование системы RTCA в проведенном исследовании позволило получить и проанализировать данные относительно влияния гепарина (1 МЕ/мл) на способность МСК к инвазии и пролиферации в условиях сокультивирования *in vitro*. Согласно полученным результатам было выявлено, что гепарин в концентрации 1 МЕ/мл оказывает ингибирующее влияние на миграционную способность культуры МСК (в сравнении с данными, полученными при оценке контрольной группы), что продемонстрировано снижением уровня индекса клеточной миграции в модели «МСК + гепарин»

($p < 0,05$). Ранее в одной из наших работ было показано, что гепарин в высоких концентрациях (1,3; 13; 130; 260 МЕ/мл) проявлял индуцирующее влияние на миграционную активность МСК при их *in vitro* сокультивировании, тем самым повышая миграционную способность данной культуры [17]. F. Seeger et al. (2012) убедительно продемонстрировали, что гепарин блокирует сигнальную передачу между SDF1/CXCR4 посредством физического взаимодействия и связывания как с рецептором, так и с лигандом, таким образом нарушая процессы миграции и хоуминга моноклеарных клеток костного мозга [18]. Данные зарубежных исследователей соответствуют полученным нами результатам.

Кроме того, согласно полученным нами данным, можно сделать вывод о повышении пролиферативной способности МСК в 2D модели при сокультивировании с гепарином (1 МЕ/мл): индекс клеточной пролиферации (ИКП) в этой группе по истечении 92 часов культивирования вырос относительно контрольной модели исследования. Полученные результаты согласуются с данными, предполагающими индуцирующее влияние гепарина на пролиферативную и функциональную активность МСК, что было показано в исследовании S. Laner-Plamberger et al. (2015) [19].

Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что *in vitro* культивирование МСК в течение 92 часов в присутствии гепарина в концентрации 1 МЕ/мл позволило наблюдать его ингибирующее действие на миграционную активность МСК наряду с индуцирующим влиянием на пролиферативную активность культуры МСК. Логичным представляется тот факт, что если культура МСК утрачивает способность к миграции (при сохранении жизнеспособности), значит происходит переключение процессов и активируются процессы дифференцировки и созревания, заложенные в программе клеток [20]. В данном случае, в контексте настоящего эксперимента, определяющими факторами клеточного поведения МСК могут быть молекулы гепарина.

Результаты по оценке экспрессии мРНК генов остеодифференцировки: *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*, *ALPL* и гена клеточной адгезии *CD49d* демонстрировали высокие уровни в модели «МСК + гепарин» (1 МЕ/мл) относительно контрольной группы.

Ранее было показано влияние гепарина на Wnt-сигнальные пути и другие факторы роста, которые могут регулировать Wnt-зависимую пролиферацию и дифференцировку остеобластов. Через активацию BMP2 гепарин опосредованно регулировал уровни *RUNX2* и, соответственно, продукцию и активность щелочной фосфатазы (*ALPL*), тем самым управляя ранней дифференцировкой в сторону остеобластов [4].

Известно, что *RUNX2* контролирует развитие скелета и дифференцировку остеобластов за счет увеличения экспрессии ряда остеодифференцировочных генов. Кроме того, *RUNX2* индуцирует активность щелочной фосфатазы (*ALPL*) и минерализацию матрикса в мезенхимальных и остеобластных клетках *in vitro* [21, 22].

Выявленный нами рост уровня экспрессии гена *ALPL* в 14-дневных культурах МСК в моделях культивирования в присутствии гепарина также может свидетельствовать в пользу дифференцировки МСК в остеогенном направлении. *ALPL* является маркером костной ткани, экспрессия которого стимулируется обработкой морфогенетическим белком-2 (*BMP2*), активацией рецепторов BMP, а также экспрессией *Dlx5* и *RUNX2* [23]. В целом внутриклеточная экспрессия гена щелочной фосфатазы (*ALPL*) проявляется на ранних этапах остеогенеза [24]. Присутствие данного белка в межклеточной среде необходимо для процесса минерализации внеклеточного матрикса [25]. W. Liu et al. (2018) показали, что мутация *ALPL* нарушает остеогенную дифференцировку МСК, полученных из костного мозга, из-за препятствия активации пути Wnt/ β -катенин [26].

Факт повышения экспрессии мРНК гена *BMP2* в модели «МСК + гепарин» может свидетельствовать в пользу инициации раннего этапа остеодифференцировки в данной модели исследования в связи с тем, что гепарин за счет физического взаимодействия с антагонистами белка *BMP2* способен увеличивать егоработку внутри клетки и активность, что, соответственно, положительно влияет на процесс остеодифференцировки. Гепарин проявляет множество типов биологической активности, связываясь с различными внеклеточными молекулами, тем самым играет ключевую роль в метаболизме различных тканей, в том числе костей. Также гепарин оказывает комплексное воздействие на остеогенную биологическую

активность BMP2. Так, продолжительное культивирование с гепарином стимулировало BMP2-индуцированную остеогенную активность посредством подавления антагонистов BMP2 и опосредуя дифференцировку культуры преостеобластов в сторону остеобластов [27].

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 [28]. Было показано, что BMP6 привлекает недифференцированные МСК из окружающих тканевых источников и может стимулировать их пролиферацию и дифференцировку (в остеогенном и хондрогенном направлениях) [29].

Параметры адгезии, включая плотность распределения клеток, межклеточные контакты и форму клеток, могут оказывать влияние на клеточную дифференцировку [30]. Например, в работе R. Peng et al. (2011) однозначно показано, что на дифференцировку отдельной клетки, как адипогенную, так и остеогенную, в значительной степени влияет ее форма [31]. В исследовании Dr. L. Zhang et al. (2019) описано использование потенциально чувствительных поверхностей для регуляции адгезии, а также влияние на управление дифференцировкой стволовых клеток через адгезивную активность [32]. Интересно, что G. Saux et al. (2020) показали, что остеогенная дифференцировка МСК человека ограничивается кадгерин-опосредованными межклеточными сигналами адгезии и стимулируется интегрин-опосредованными сигналами за счет усиления напряжения цитоскелета [33]. Так, интегрин VLA-4, экспрессирующийся на поверхности МСК, состоит из двух субъединиц — $\alpha 4$ и $\beta 1$ (CD49d и CD29 соответственно) и принимает непосредственное участие в процессах клеточной адгезии и миграции [34]. Это было убедительно показано в экспериментах по миграции клеток *ex vivo*, свидетельствующих об участии CD49d в миграции Т-лимфоцитов в мышечную ткань [35].

Интересно отметить, что уровень относительной экспрессии мРНК гена *CD49d* в модели «МСК + гепарин» (1 МЕ/мл) был выше значений, полученных при оценке контрольной модели исследования. Мы предполагаем, что высокая экспрессия *CD49d* может носить компенсаторный характер в связи со способностью молекулы

гепарина связываться с интегрином VLA-4 [36]. Известно, что чем меньше мономеров в составе молекулы гепарина (например, НМГ), тем менее выражен его ингибирующий эффект на адгезию клеток.

Согласно данным литературы, гепарин взаимодействует с большим количеством биологически активных молекул (в т.ч. цитокины, хемокины, факторы роста) [37], потенциально продлевая период их полужизни за счет защиты от протеолитической деградации или усиления их сигнальной способности, опосредованной взаимодействием с рецептором на клеточной поверхности [38].

Анализ уровня секреции ростовых факторов, хемокинов и молекул с про- и противовоспалительным действием в супернатантах клеточных культур на 14-е сутки позволил установить, что при сокультивировании МСК в присутствии гепарина их секреторная способность претерпела значительные изменения. Концентрация исследуемых нами факторов (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, TNF α , TRAIL, SDF-1 α , MCP-1, IL-8, за исключением VEGF и IL-6), определяемых нами в супернатантах культур МСК в модели «МСК + гепарин» была ниже аналогичных значений контрольной группы. Таким образом, гепарин в группе «МСК + гепарин» оказывал ингибирующее влияние на цитокинпродуцирующую активность МСК, за исключением продукции этими клетками VEGF и IL-6, что требует дополнительного исследования.

Причиной выявленных нами изменений, а именно низкого содержания биологически активных молекул в группе «МСК + гепарин», может быть способность гепарина дестабилизировать мРНК цитокинов посредством конкуренции с этими транскриптами мРНК за РНК-связывающие белки [39]. Кроме того, также было показано, что основной сульфатированный гликозаминогликан стромы костного мозга мыши, гепарансульфат, обладает способностью адсорбировать как GM-CSF, так и IL-3.

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* [40]. 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.

VEGF является мощным ангиогенным фактором, усиливающим дифференцировку эндотелиальных клеток *in vitro* и потенцирующим неоваскуляризацию [41]. Косвенным эффектом VEGF является инициация клеточной судьбы МСК в сторону остеогенной линии, что индуцирует большее количество остеобластов в месте заживления, за счет чего проявляется двойной эффект фактора VEGF [42]. Если ориентироваться на данные литературы, то повышенная продукция VEGF в группе исследования с гепарином может быть связана с процессами ангиогенеза и остеогенным потенциалом воздействующих на МСК факторов [43].

Спустя 14 дней сокультивирования уровень ростового фактора HGF (Hepatocyte growth factor) в модели «МСК + гепарин» был значительно ниже относительно уровня в контрольной группе исследования. Ранее было продемонстрировано, что ростовой фактор HGF вносит решающий вклад в миграцию, пролиферацию, дифференцировку и выживаемость культуры МСК [44]. 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-МАРК и STAT3) [45]. Таким образом, снижение продукции HGF может повышать миграционную активность и снижать пролиферативную активность МСК, что было продемонстрировано нами полученными результатами с помощью методики RTCA.

Далее нами было оценено влияние гепарина (1 МЕ/мл) в условиях сокультивирования с МСК на формирование культурой участков минерализации межклеточного матрикса на 21-е сутки. Полученные нами данные демонстрировали статистически значимое увеличение площади минерализованной области на пластике в моде-

лях, культивируемых с гепарином (относительно контрольной группы исследования).

Становится очевидным, что минерализация внеклеточного матрикса в культуре МСК, вызванная их созреванием и дифференцировкой в остеогенном направлении при сокультивировании с гепарином (1 МЕ/мл) протекает в условиях не только изменения иммунофенотипического профиля МСК и экспрессии генов остеодифференцировки и клеточной адгезии, но и секреции важных функциональных биомолекул (ростовых факторов, хемокинов, провоспалительных цитокинов и т.д.).

Заключение

Резюмируя вышесказанное, выявленное нами в модели «МСК + гепарин» повышение (в сравнении с контролем) уровней относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*) и адгезии (*CD49d*), увеличение пролиферативной и снижение миграционной активности, а также статистически значимое снижение количества клеток, несущих на себе маркеры МСК (*CD73*, *CD90*, *CD105*), наряду с увеличением площади минерализации в исследуемой клеточной культуре с добавлением гепарина (1 МЕ/мл), может свидетельствовать об участии гепарина в инициации процесса дифференцировки МСК в остеогенном направлении в условиях культивирования *in vitro*.

Полученные результаты интересны в области регенеративной медицины, связанной с системным введением МСК для коррекции хронических заболеваний. С другой стороны, их следует учитывать в послеоперационной тактике ведения пациентов при эндопротезировании крупных суставов. Данные могут послужить базисом для разработки новых стратегий и тактик ведения для пациентов хирургического профиля с высоким риском послеоперационного тромбообразования, в том числе при операциях остеосинтеза.

Финансирование исследования: Данное исследование выполнено при поддержке Государственного задания (FZWM-2020-0010).

Funding: Study performed under state assignment (FZWM-2020-0010).

Литература

1. Labarrere CA, Dabiri AE, Kassab GS. Thrombogenic and Inflammatory Reactions to Biomaterials in Medical Devices. *Front. Bioeng. Biotechnol*, 2020;8:123.
2. Han Q, Shea SM, Arleo T, Qian JY, Ku DN. Thrombogenicity of biomaterials depends on hemodynamic shear rate. *Artificial organs*. 2022;46(4):606–617.
3. Shah FA, Thomsen P, Palmquist A. Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta Biomaterialia*. 2019;84:1–15.
4. da Costa FHB, Lewis MS, Truong A, Carson DD, Farach-Carson MC. SULF1 suppresses Wnt3A-driven growth of bone metastatic prostate cancer in perlecan-modified 3D cancer-stroma-macrophage triculture models. *Plos One*. 2020;15(5):e0230354.
5. Brkljacic J, Pauk M, Erjavec I, Cipic A, Grgurevic L, Zadro R., Inman GJ, Vukicevic S. Exogenous heparin binds and inhibits bone morphogenetic protein 6 biological activity. *International Orthopaedics*. 2013;37(3):529–541.
6. Moll G, Ankrum JA, Olson SD, Nolte JA. Improved MSC Minimal Criteria to Maximize Patient Safety: A Call to Embrace Tissue Factor and Hemocompatibility Assessment of MSC Products. *Stem Cells Translational Medicine*. 2022;11(1):2–13.
7. Broeke J, Pérez JMM, Pascau J. *Image Processing with Image J*. 2nd Edition. UK: Packt Publishing (2015). 256 p.
8. Simann M, Schneider V, Le Blanc S, Dotterweich J, Zehe V, Krug M, Jakob F, Schilling T, Schütze N. Heparin affects human bone marrow stromal cell fate: Promoting osteogenic and reducing adipogenic differentiation and conversion. *Bone*. 2015;78:102–113.
9. Ling L, Camilleri ET, Helledie T, Samsonraj RM, Titmarsh DM, Chua RJ, Dreesen O, Dombrowski C, Rider DA, Galindo M, Lee I, Hong W, Hui JH, Nurcombe V, van Wijnen AJ, Cool SM. Effect of heparin on the biological properties and molecular signature of human mesenchymal stem cells. *Gene*. 2016;576(1):292–303.
10. Li Y, Fung J, Lin F. Local Inhibition of Complement Improves Mesenchymal Stem Cell Viability and Function After Administration. *Molecular Therapy*. 2016; 24(9):1665–1674.
11. Jain M, Minocha E, Tripathy NK, Singh N, Chaturvedi CP, Nityanand S. Comparison of the Cardiomyogenic Potency of Human Amniotic Fluid and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*. 2019;12:449–456.
12. Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR, Pic-Taylor A, Toledo OA, Marti LC, Azevedo RB, Oliveira DM. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cell. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016;7:97.
13. Qu C, Brohlin M, Kingham PJ, Kelk P. Evaluation of growth, stemness, and angiogenic properties of dental pulp stem cells cultured in cGMP xeno-/serum-free medium. *Cell and Tissue Research*. 2020;380:93–105.
14. Pham LH, Vu NB, Pham PV. The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105 positive mesenchymal stem cells. *Biomedical Research and Therapy*. 2019;6(4):3131–3140.
15. Tan K, Zhu H, Zhang J, Ouyang W, Tang J, Zhang Y, Qiu L, Liu X, Ding Z, Deng X. CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity. *Stem Cells International*. 2019;2019:12.
16. Kimura K, Breitbach M, Schildberg FA, Hesse M, Fleischmann BK. Bone marrow CD73+ mesenchymal stem cells display increased stemness *in vitro* and promote fracture healing *in vivo*. *Bone Reports*. 2021;15:101–133.
17. Норкин ИК, Юрова КА, Хазиахматова ОГ, Мелашченко ЕС, Мелашченко ВВ, Шунькин ЕО и др. Стимулирующее влияние высоких доз гепарина на миграционную активность и сохранение стволовости МСК в присутствии остеозамещающих материалов. *Медицинская иммунология*. 2021;23(4):831–838. DOI: 10.15789/1563-0625-SEO-228
Norkin IK, Yurova KA, Khaziakhmatova OG, Melashchenko ES, Malashchenko VV, Shunkin EO, Khlusov IA, Litvinova LS. Stimulating effect of high dose heparin on migration activity and MSC stemness preservation in the presence of bone-substituting materials. *Medical Immunology/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 831–838. DOI: 10.15789/1563-0625-SEO-228

18. Seeger FH, Rasper T, Fischer A, Muhly-Reinholz M, Hergenreider E, Leistner DM, Sommer K, Manavski Y, Henschler R, Chavakis E, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Heparin disrupts the CXCR4/SDF-1 axis and impairs the functional capacity of bone marrow-derived mononuclear cells used for cardiovascular repair. *Circulation Research*. 2012;111(7):854–862.
19. Laner-Plamberger S, Lener T, Schmid D, Streif DA, Salzer T, Öller M, Hauser-Kronberger C, Fischer T, Jacobs VR, Schallmoser K, Gimona M, Rohde E. Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13:354.
20. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*. 2019;8(8):784.
21. Kim J, Yang Y, Park KH, Ge X, Xu R, Li N, et al. A RUNX2 stabilization pathway mediates physiologic and pathologic bone formation. *Nature Communications*. 2020;11:2289.
22. Iyyanara PPR, Thangaraja MP, Eames BF, Nazarali AJ. Htra1 is a Novel Transcriptional Target of RUNX2 That Promotes Osteogenic Differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53(5):832–850.
23. Yu S, Guo J, Sun Z, Lin C, Tao H, Zhang Q, et al. BMP2-dependent gene regulatory network analysis reveals Klf4 as a novel transcription factor of osteoblast differentiation. *Cell Death & Disease*. 2021;12:197.
24. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855.
25. Zheng J, Zhao F, Zhang W, Mo Y, Zeng L, Li X, Chen X. Sequentially-crosslinked biomimetic bioactive glass/gelatin methacryloyl composites hydrogels for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2018; 89:119–127.
26. Liu W, Zhang L, Xuan K, Hu C, Li L, Zhang Y, Jin F, Jin Y. Alkaline Phosphatase Controls Lineage Switching of Mesenchymal Stem Cells by Regulating the LRP6/GSK3 β Complex in Hypophosphatasia. *Theranostics*. 2018;8(20):5575–5592.
27. Smith RAA, Murali S, Rai B, Lu X, Lim ZXH, Lee JLL, et al. Minimum structural requirements for BMP-2-binding of heparin oligosaccharides. *Biomaterials*. 2018;184:41–55.
28. Perry MJ, McDougall KE, Hou S, Tobias JH. Impaired growth plate function in *bmp-6* null mice. *Bone*. 2008;42(1):216–225.
29. Jeon H, Yoon K, An ES, Kang T-W, Sim Y-B, Ahn J, et al. Therapeutic Effects of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Cartilage Acellular Matrix Mediated Via Bone Morphogenic Protein 6 in a Rabbit Model of Articular Cruciate Ligament Transection. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2020;16:596–611.
30. Wang X, Ye K, Li Z, Yan C, Ding J. Adhesion, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells on RGD nanopatterns of varied nanopacings. *Organogenesis*. 2013;9(4):280–286.
31. Vasilevich AS, Vermeulen S, Kamphuis M, Roumans N, Eroumé S, Hebels DGJ, et al. On the correlation between material-induced cell shape and phenotypical response of human mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*. 2020;10:18988.
32. Zhang L, Wang Z, Das J., Labib M, Ahmed S, Sargent EH, Kelley SO. Potential-Responsive Surfaces for Manipulation of Cell Adhesion, Release, and Differentiation. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019;58(41):14519–14523.
33. Le Saux G, Wu MC, Toledo E, Chen Y-Q, Fan Y-J, Kuo J-C, Schwartzman M. Cell–Cell Adhesion-Driven Contact Guidance and Its Effect on Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020;12(20):22399–22409.
34. Chigaev A, Smagley Y, Sklar LA. Carbon monoxide down-regulates $\alpha 4\beta 1$ integrin-specific ligand binding and cell adhesion: a possible mechanism for cell mobilization. *BMC Immunology*. 2014;15:52.
35. Pinto-Mariz F, Carvalho LR, Araujo APDQC, Mello WD, Ribeiro MG, Cunha MDCSA, et al. CD49d is a disease progression biomarker and a potential target for immunotherapy in Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*. 2015;5:45.
36. Gockel LM, Heyes M, Li H, Nahain AA, Gorzelanny C, Schlesinger M, et al. Inhibition of Tumor–Host Cell Interactions Using Synthetic Heparin Mimetics. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2021;13(6):7080–7093.

К.А. Юрова и др.

Изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК-ЖТ при *in vitro* сокультивировании с гепарином

37. Le Gall J, Dehainault C, Benoist C, Matet A, Lumbroso-Le Rouic L, et al. Highly Sensitive Detection Method of Retinoblastoma Genetic Predisposition and Biomarkers. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*. 2021;23(12):1714–1721.
38. Chiodelli P, Bugatti A, Urbinati C, Rusnati M. Heparin/Heparan Sulfate Proteoglycans Glycomic Interactome in Angiogenesis: Biological Implications and Therapeutical Use. *Molecules*. 2015;20(4):6342–6388.
39. Abbadi A, Loftis J, Wang A, Yu M, Wang Y, Shakya S, et al. Heparin inhibits proinflammatory and promotes anti-inflammatory macrophage polarization under hyperglycemic stress. *Journal of biological chemistry*. 2020;295(15):4849–4857.
40. Dregalla RC, Herrera JA, Koldewyn LS, Donner EJ. The Choice of Anticoagulant Influences the Characteristics of Bone Marrow Aspirate Concentrate and Mesenchymal Stem Cell Bioactivity In Vitro. *Stem Cells International*. 2022;2022:1–12.
41. Ge Q, Zhang H, Hou J, Wan L, Cheng W, Wang X, et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms. *Molecular Medicine Reports*. 2018;17(1):1667–1675.
42. Berendsen AD, Olsen BR. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*. 2014;62(2):103–108.
43. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 2016;91:30–38.
44. Witt R, Weigand A, Boos AM, Cai A, Dippold D, Boccaccini AR, et al. Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering. *BMC Cell Biology*. 2017;18:15.
45. Frisch RN, Curtis KM, Aenlle KK, Howard GA. Hepatocyte Growth Factor and Alternative Splice Variants — Expression, Regulation and Implications in Osteogenesis and Bone Health and Repair. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2016;20(9):1087–1098.

Об авторах

Юрова Кристина Алексеевна — к.м.н., с.н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Хазиахматова Ольга Геннадьевна — к.б.н., с.н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Малашенко Владимир Владимирович — к.б.н., н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Мелашенко Ольга Борисовна — н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Хлусов Игорь Альбертович — профессор, д.м.н., г.н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Лигатюк Денис Дмитриевич — инженер Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Иванов Павел Александрович — к.м.н., м.н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Литвинова Лариса Сергеевна — д.м.н., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Authors

Kristina A. Yurova — PhD, Senior Researcher Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Olga G. Khaziakhmatova — PhD, senior researcher Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Vladimir V. Malashchenko — PhD, researcher Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Olga B. Melashchenko — researcher Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Igor A. Khlusov — Professor, Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Denis D. Ligatyuk — Engineer, Center for Immunology and Cellular Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Pavel A. Ivanov — PhD, Junior Researcher at the Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Larisa S. Litvinova — Doctor of Medical Sciences, Director of the Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.