



УДК 611.018(41+43):616.71-089.844
DOI: <https://doi.org/10.35693/SIM635822>

© This work is licensed under CC BY 4.0
© Authors, 2024

Оценка биосовместимости и остеокондуктивности гибридного клеточно-тканевого трансплантата для регенеративной медицины костной ткани

Н.Н. Данилкович¹, С.М. Космачева¹, А.Г. Ионова¹, К.А. Криворот², А.Н. Мазуренко², Д.Г. Алексеев³

¹Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь)

²Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии (Минск, Беларусь)

³ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (Самара, Российская Федерация)

Аннотация

Цель – оценить биосовместимость и остеокондуктивность *in vitro* гибридного клеточно-тканевого трансплантата для регенеративной медицины костной ткани на основе биоорганического матрикса, мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (КМ-МСК) человека и остеогенных факторов роста.

Материал и методы. Исследованы на биосовместимость с культурой КМ-МСК человека биоорганические матриксы, используемые в травматологии и ортопедии. Для направленной остеогенной дифференцировки КМ-МСК использовали аллогенную плазму, обогащенную растворимыми факторами тромбоцитов. Остеогенный потенциал КМ-МСК анализировали по синтезу последними мРНК ранних (фактора транскрипции 2 / Run X2, щелочная фосфатаза / ALP) и поздних генов (остеопонтин / OSP) остеогенеза. Свойства клеточной адгезии и пролиферации КМ-МСК в условиях трехмерного гибридного трансплантата оценивали с помощью МТТ-теста и флуоресцентной микроскопии.

Результаты. Установлена биосовместимость исследуемых биоорганических матриксов с КМ-МСК человека. Отмечена быстрая адгезия и пролиферация клеток между волокнами используемых матриксов. Также уста-

новлено, что аллогенная плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, достоверно влияет на остеогенную дифференцировку КМ-МСК человека *in vitro*, усиливая экспрессию маркерных генов RunX2, ALP, OSP. При имитации трехмерного гибридного клеточно-тканевого трансплантата *in vitro* показано формирование плотного контакта между аллогенной спонгиозой (костной тканью) и биоорганическим матриксом с помощью остеогенно предифференцированных КМ-МСК.

Выводы. Биологические свойства разработанного гибридного клеточно-тканевого трансплантата характеризуются биосовместимостью и остеокондуктивностью, что делает его перспективным для применения в регенеративной медицине, особенно в реконструктивной хирургии костных дефектов.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, костный мозг, биополимеры, биоорганический матрикс, биосовместимость, обогащенная тромбоцитами аллогенная плазма, гибридный клеточно-тканевый трансплантат.

Конфликт интересов: не заявлен.

Для цитирования:

Данилкович Н.Н., Космачева С.М., Ионова А.Г., Криворот К.А., Мазуренко А.Н., Алексеев Д.Г. Оценка биосовместимости и остеокондуктивности гибридного клеточно-тканевого трансплантата для регенеративной медицины костной ткани. Наука и инновации в медицине. 2024;9(4):256-267.
DOI: <https://doi.org/10.35693/SIM635822>

Сведения об авторах

Данилкович Н.Н. – научный сотрудник лаборатории биологии и генетики стволовых клеток.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1245-0426>

E-mail: nndanilkovich@gmail.com

Космачева С.М. – заведующая лабораторией биологии и генетики стволовых клеток.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1617-8845>

E-mail: 4kosmacheva@mail.ru

Ионова А.Г. – младший научный сотрудник лаборатории биологии и генетики стволовых клеток.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-3884-9112>

E-mail: al_ionova96@mail.ru

Криворот К.А. – канд. мед. наук, доцент, заместитель директора по организационно-методической работе, врач-нейрохирург высшей квалификационной категории.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0456-2839>

E-mail: kirill.doc@mail.ru

Мазуренко А.Н. – канд. мед. наук, заведующий нейрохирургическим отделением №2.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7092-2615>

E-mail: mazurenko@mail.ru

Алексеев Д.Г. – канд. мед. наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИИ «БиоТех».

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4185-0709>

E-mail: D.G.Alekseev@samsmu.ru

Список сокращений

алПОРФТ – аллогенная плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ЕД – единицы действия; ИФА – иммуноферментный анализ; КМ – костный мозг; ЛКМ – лиофилизированный костный матрикс; МСК – мезенхимальная стромальная клетка; МТТ-тест – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток; ОС – остеогенная среда; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция ПЦР; ППС – полная питательная среда; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РНК – рибонуклеиновая кислота; сГАГ – сульфатированные глюкозаминогликаны; ТК – тромбоцитарный концентрат; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ФТС – фетальная телячья сыворотка; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

Автор для переписки

Данилкович Наталия Николаевна

Адрес: РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Долгиновский тракт, 160, г. Минск, Республика Беларусь, 220053.

E-mail: nndanilkovich@gmail.com

Получено: 08.07.2024

Одобрено: 18.09.2024

Опубликовано: 29.10.2024

Evaluation of biocompatibility and osteoconductivity of a hybrid cell-tissue graft for bone regenerative medicine

Nataliya N. Danilkovich¹, Svetlana M. Kosmacheva¹, Aleksandra G. Ionova¹,

Kirill A. Krivorot², Andrei N. Mazurenka², Denis G. Alekseev³

¹Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnology (Minsk, Belarus)

²Republican Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics (Minsk, Belarus)

³Samara State Medical University (Samara, Russian Federation)

Abstract

Aim – to evaluate *in vitro* the biocompatibility and osteoconductivity of a hybrid graft based on a bioorganic matrix, human bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSC) and osteogenic growth factors.

Material and methods. Bioorganic matrices were studied for biocompatibility with human BM-MSC culture used in traumatology and orthopedics. For promoted osteogenic differentiation of BM-MSCs, allogeneic plasma enriched with soluble platelet factors was used. The osteogenic potential of BM-MSCs by the synthesis of mRNAs of early (transcription factor 2 (Run X2), alkaline phosphatase (ALP)) and late genes (osteopontin (OSP)) of osteogenesis was analyzed. The properties of cell adhesion and proliferation of MSCs in the conditions of a three-dimensional hybrid graft by the MTT test and fluorescence microscopy were assessed.

Results. The biocompatibility of the studied bioorganic matrices with human BM-MSCs was established. The collagen matrix promoted rapid cell adhesion

and proliferation between the scaffold fibrils. It has also been established that allogeneic platelet-rich plasma affects the osteogenic differentiation of human BM-MSCs *in vitro*, increasing the expression of marker genes RunX2, ALP, OSP. When modeling a hybrid graft *in vitro*, the formation of a tight contact between the alloimplant and collagen biopolymer using MSCs was shown.

Conclusion. The biological properties of the developed hybrid cell-tissue graft characterize its biocompatibility and osteoconductivity of its constituent components, which makes it promising for use in regenerative medicine, especially in reconstructive surgery of bone defects.

Keywords: human bone marrow mesenchymal stromal cells, scaffolds, biopolymers, bioorganic matrix, biocompatibility, platelet-rich plasma, hybrid cell-tissue graft.

Conflict of interest: nothing to disclose.

Citation

Danilkovich NN, Kosmacheva SM, Ionova AG, Krivorot KA, Mazurenka AN, Alekseev DG. Evaluation of biocompatibility and osteoconductivity of a hybrid cell-tissue graft for bone regenerative medicine. *Science and Innovations in Medicine*. 2024;9(4):256-267. DOI: <https://doi.org/10.35693/SIM635822>

Information about authors

Nataliya N. Danilkovich – Scientific officer of the laboratory of Stem Cell Biology and Genetics.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1245-0246>

E-mail: nndanilkovich@gmail.com

Svetlana M. Kosmacheva – PhD, Associate professor, Head of the laboratory of Stem Cells Biology and Genetics.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1617-8845>

E-mail: 4kosmacheva@mail.ru

Aleksandra G. Ionova – Junior researcher of the laboratory of Stem Cells Biology and Genetics.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-3884-9112>

E-mail: al_ionova96@mail.ru

Kirill A. Krivorot – PhD, Associate professor, Deputy Director for Organizational and Methodological work, neurosurgeon of the highest qualification category.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0456-2839>

E-mail: kirill.doc@mail.ru

Andrei N. Mazurenka – Head of Neurosurgical Department №2, PhD, Associate professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7092-2615>

E-mail: mazurenko@mail.ru

Denis G. Alekseev – PhD, Associate professor, Leading researcher at the BioTech Research Institute.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4185-0709>

E-mail: D.G.Alekseev@samsmu.ru

Corresponding Author

Nataliya N. Danilkovich

Address: Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnology, 160 Dolginovsky Trakt, Minsk, Belarus, 220053.

E-mail: nndanilkovich@gmail.com

Received: 08.07.2024

Accepted: 18.09.2024

Published: 29.10.2024

ВВЕДЕНИЕ

«Золотым стандартом» в восстановлении костных дефектов критического размера, не способных к самостоятельному заживлению и поддерживающих хроническое воспаление, является проведение костно-реконструктивных операций в варианте ауто- и аллопластики. Последний вариант является более распространенным и приемлемым для пациентов, поскольку использование аллогенных имплантов не подразумевает дополнительного травмирования донорского участка, а также исключает развитие связанных с этим потенциальных осложнений (кровотечение, нагноение). Дальнейшим развитием метода аллопластики для восстановления незаживающих дефектов является регенеративная медицина с использованием бесклеточных биоматериалов, клеточных трансплантатов, остеогенных факторов роста, имплантация девитализированных аллогенных костных эквивалентов и биомедицинских клеточных продуктов из комбинаций живых клеток, биоматериалов и факторов роста. С костной тканью и ее формированием связано несколько популяций клеток, но наиболее важными являются остеобласты, остециты и остеокласты, которые отвечают за

образование кости (остеогенез), поддержание и резорбцию соответственно. Данные популяции клеток происходят из мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (КМ-МСК). В сравнении с МСК из жировой ткани и пупочной вены КМ-МСК демонстрируют достоверно более высокую эффективность остеогенной дифференцировки, что определяет их терапевтическую перспективу в клеточной трансплантологии и регенеративной медицине опорных тканей [1–6].

Остеогенная дифференцировка КМ-МСК *in vitro* легко стимулируется в однослойной культуре клеток добавлением β-глицерофосфата, гидрокортизона или дексаметазона и аскорбиновой кислоты, что подтверждается увеличением экспрессии ранних (Runx2 – Runt-ассоциированные факторы транскрипции 2; ALP – щелочной фосфатаза; BMP2 – костный морфогенетический белок 2 и остеоонектин) и поздних генов (OSP – остеоопонтин, остеокальцин) остеогенной дифференцировки [7]. Другие факторы роста также способны действовать как индукторы остеогенной дифференцировки в отношении КМ-МСК, а именно представители суперсемейства TGF-β (трансформирующего фактора роста бета); IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста 1);

FGF (фактор роста фибробластов); PDGF (факторы роста тромбоцитов) и VEGF (сосудистые эндотелиальные факторы роста) [1, 8].

Пролиферация КМ-МСК и их дифференцировка в остеобласты регулируются также клеточным микроокружением и сигнальными молекулами в процессах ремоделирования костной ткани и восстановлении незаживающих дефектов. Совместное использование КМ-МСК с остеокондуктивными носителями (матриксами, скаффолдами) может быть эффективной альтернативой замещению костных дефектов аутологичными графтами и аллогенными имплантатами [9, 10]. Независимо от метода лечения необходимым условием регенерации кости является использование биоматериалов, имеющих адгезивную поверхность для прикрепления остеогенных клеток и способных проводить сигналы для дифференцировки последних в остеобласты в ответ на остеоиндукцию [11]. Введение клеток в зону дефекта кости инъекционным способом малоэффективно в силу невозможности длительного их локального присутствия с получением стимулирующего воздействия для старта процесса регенерации ткани, поэтому целесообразно пересаживать их на носителях (матриксах, скаффолдах), изготовленных из биополимеров [12].

Клеточные носители в зависимости от происхождения можно разделить на следующие группы: неорганические материалы, такие как титан или керамика из трикальций-фосфата [13]; синтетические биополимеры, например, полигидроксикислоты (полигликолевая кислота, полимолочная кислота, полидиоксанон); природные биополимеры, например, коллаген, желатин, хитозан или агароза [14]; комбинированные (композитные) материалы [15].

По отношению к стимуляции регенерации такие носители должны быть биорезорбируемыми и иметь остеоиндуктивный, остеокондуктивный или комбинированный эффект.

Матрикс и скаффолды должны иметь пористую структуру, которая обеспечивает прикрепление клеток, их пролиферацию и дифференцировку и является проницаемой для биологически активных веществ [16–19]. Ответ клеток может зависеть от физических и биологических особенностей биоматериала, используемого в качестве носителя. Эти особенности, такие как топография, шероховатость, химический состав, поверхностная энергия и заряд, имитирующие внеклеточный матрикс нативной ткани, регулируют клеточную морфологию и, таким образом, дифференцировку, а также присутствие биоактивных лигандов, которые могут обеспечить сайты заякоривания для прикрепления клеток [20, 21].

Композитные носители, сочетающие пористость (микроструктура), биоактивность (остеоиндуктивность, остеокондуктивность), биорезорбируемость и близкие по свойствам к нативному внеклеточному матриксу костной ткани, потенциально можно рассматривать как наиболее перспективные матриксы или скаффолды для стволовых клеток в тканевой инженерии кости. Стимуляция остеогенной дифференцировки КМ-МСК клеток такими остеоиндуктивными и остеокондуктивными носителями

может быть усилена применением остеогенных факторов роста, имеющихся в клетках крови, а именно в тромбоцитах [22–25].

В гранулах тромбоцитов идентифицировано более 30 факторов роста, в том числе факторы регенерации костной ткани: TGF- β (трансформирующий фактор роста β) и BMP (костные морфогенетические белки), которые модулируют пролиферацию клеток, стимулируют образование остеобластов и внеклеточного костного матрикса, тормозят его деградацию и проявляют иммуносупрессивный эффект. Помимо тромбоцитарных факторов, активными участниками остеогенеза являются также белки плазмы крови, такие как фибрин, фибронектин и витронектин [26]. R.E. Marx и соавт. (1998) [27] использовали у пациентов аутологичные трансплантаты из подвздошной кости, пропитанные аутологичной же плазмой, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ, или PRP – Platelet Rich Plasma) для реконструкции челюстно-лицевых дефектов и обнаружили, что это ускоряет скорость формирования костной ткани и способствует более высокой плотности последней. Другие исследователи не сообщили о таких заметных преимуществах ПОРФТ при ее комбинации с деминерализованным аллогенным костным матриксом в гибридных клеточно-тканевых трансплантатах на модели иммунодефицитных мышей (nude mouse) для регенерации кости [28].

■ ЦЕЛЬ

Оценить биосовместимость и остеокондуктивность *in vitro* гибридного клеточно-тканевого трансплантата для регенеративной медицины костной ткани на основе биополимерного матрикса, КМ-МСК человека и остеогенных факторов роста.

■ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Образцы биоорганических матриксов

В исследование вошли четыре варианта коммерческих биоорганических матрикса:

- «Коллапан», в состав которого входят биополимер, являющийся основой органического компонента костной ткани, а именно коллаген I типа, а также гидроксиапатит с добавлением антибиотика линкомицина гидрохлорида («Интермедпатит», Россия)¹;
- «Остеоматрикс» – высокоочищенный костный матрикс с природной гистоархитектоникой, сохраненными органическими коллагеновыми (25%) и минеральными (75%) компонентами, содержащий не менее 1,5 мг/см³ аффинно-связанных костных сульфатированных биополимеров глюкозаминогликанов (сГАГ) («Конектбиофарм», Россия)²;
- «Лиостипт» – резорбируемая биополимерная коллагеновая губка, изготовленная из натуральных бычьих сухожилий (B. Braun, Испания)³;
- «Лиофилизированный костный матрикс» (ЛКМ) – иммунологически безопасный и стерильный костный аллогенный биоимплантат, приготовленный из поствитального донорского материала («Минский научно-практический

¹ Доступно по: <https://collapan.ru>

² Доступно по: <https://bioimplantat.ru/>

³ Доступно по: <https://catalogs.bbraun.com/en-01/p/PRID00000356/lyostypt-local-haemostatic-agent>

центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Беларусь) [29, 30].

Получение плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов

Все клинические процедуры и забор донорской крови проводили в соответствии с правилами безопасности, описанными в руководстве Всемирной организации здравоохранения [31]. С этой целью применяли аллогенную плазму, обогащенную растворимыми факторами тромбоцитов (алПОРФТ), полученную в Республиканском научно-практическом центре трансфузиологии и медицинских биотехнологий Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Для получения аллогенной ПОРФТ использовали тромбоцитарный концентрат (ТК) доноров крови, допущенных к сдаче и не имеющих маркеров вирусных инфекций (гепатит В/ВГВ, гепатит С/ВГС, вирус иммунодефицита человека/ВИЧ) после проведения иммуноферментного анализа (ИФА) и молекулярно-генетического анализа (в полимеразной цепной реакции или аналогичном).

ТК (50×10^{12} клеток в дозе) получали из донорской крови, которую собирали из локтевой вены (450 мл крови) с помощью специального набора YCELLBIO-KIT («БИО-НИР», Россия). После этого кровь центрифугировали в два этапа для удаления эритроцитов и лейкоцитов (1550 об/мин, 400 g, 20 мин) с последующим концентрированием тромбоцитов на лабораторной центрифуге Liston C 2201 («Листон», Россия) в режиме 2450 об/мин, 1000 g, 20 мин. В полученном алПОРФТ подсчитывали количество тромбоцитов на гематологическом анализаторе Sysmex XN-300 (Sysmex Corporation, Германия) – их количество должно было быть не менее $1,25 \times 10^9$ /мл. алПОРФТ от 6–10 доноров хранили в аликвотах при температуре -30°C в течение 24 месяцев. Перед использованием алПОРФТ активацию тромбоцитов проводили посредством цикла замораживания-оттаивания с последующим осаждением клеточного детрита центрифугированием (2900 об/мин, 1400 g, 20 мин). После активации алПОРФТ использовали в течение первого часа [32].

Получение культуры МСК из костного мозга человека

Для получения культуры КМ-МСК у здоровых доноров осуществляли забор 10 мл костного мозга (КМ) из гребня подвздошной кости после получения информированного согласия по решению этического комитета Республиканского научно-практического центра травматологии и ортопедии Министерства здравоохранения Республики Беларусь (протокол №3 от 14.04.2021 г.). Костномозговой пунктат содержал 20 ЕД высокомолекулярного гепарина на 1 мл КМ для инактивации процесса свертывания крови. Далее пунктат КМ разводили в соотношении 1:1 фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко без кальция и магния (ФСБ) (Sigma-Aldrich, США). Затем наслаивали 20 мл костного мозга на 15 мл среды (для разделения лимфоцитов), представляющей собой смесь фиколла и диатризоата натрия с плотностью 1,077 г/мл (Lonza, Швейцария) в центрифужных пробирках емкостью 50 мл (Corning, США). Пробирки центрифугировали при 450 g в течение 20 мин. Мононуклеарные фракции собирали в центрифужные пробирки с последующей отмывкой в α -модифицированной среде Игла с рибонуклеозидами α -MEM (Gibco, США) с 2% фетальной

телячьей сывороткой (ФТС) (Sigma-Aldrich, США) с помощью центрифугирования при 450 g и экспозиции 10 мин. Выделение КМ-МСК человека из мононуклеарной фракции осуществляли методом пластиковой адгезии в концентрации $0,3\text{--}0,6 \times 10^6$ клеток/см² в культуральных флаконах T75 (Sarstedt, Германия).

Затем клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 5% концентрации CO_2 (ESCO Cell Culture, Singapore) и при 37°C в α -модифицированной среде Игла (α -MEM) с рибонуклеозидами (Gibco, США), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Sigma-Aldrich, США), 40 мМ/мл глутамина (Gibco, США) и 100 ед/мл бензилпенициллина («Фарм-Синтез», Россия) и 0,1 мг/мл стрептомицина (Gibco, США), то есть в полной питательной среде (ППС) [33]. КМ-МСК размножали в культуральных флаконах T75 (Sarstedt, Германия) при исходной концентрации $300,0 \times 10^3$ клеток (пассажи 1 и 2). Культуральную среду меняли два раза в неделю. Когда клетки достигали 80–90% конfluence, их открепляли с использованием трипсина/ЭДТА (Sigma-Aldrich, США), а затем повторно высевали в концентрации 1500 клеток/см² (пассажи 2–3). Далее КМ-МСК были иммунофенотипированы как CD90+, CD105+, CD45-, CD34- методом проточной цитометрии. Результаты анализировали на проточном цитометре FACS (Becton Dickinson, США). Жизнеспособность оценивали методом исключения трипанового синего (не менее 90%) [34].

Оценка биосовместимости биоорганических матриц с КМ-МСК человека

Матрицы-носители применяли в эксперименте образцами по 10 мг. Далее образцы матриц выдерживали в среде α -MEM с добавлением 10% ФТС, глутамина и антибиотиков в течение 24 часов для получения супернатантов. КМ-МСК человека высевали в 24-луночный культуральный планшет (Sarstedt, Германия) в исходной концентрации $100,0 \times 10^3$ /см² и культивировали в течение 24 часов. После экспансии клеток ППС удаляли из лунок планшета и вносили подготовленные образцы матриц-носителей (нативные образцы и их супернатанты) непосредственно в лунки с КМ-МСК человека. Культивирование производили при 37°C и 5% концентрации CO_2 в CO_2 -инкубаторе (ESCO CelCulture, Сингапур) в 200 мкл ППС. Оценивали биосовместимость и способность к адгезии КМ-МСК на поверхности матриц и их супернатантов при прямом контакте после 24-часовой инкубации через 1 и 7 суток совместного культивирования путем мечения H33342 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мкг/мл. Для этого заселенные на носителях КМ-МСК человека инкубировали с раствором H33342 соответствующей концентрации при 37°C в течение 20 мин. После окрашивания клетки дважды промывали ФСБ, а затем добавляли ППС [35]. Меченые клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM200 (Leica Microsystems, Германия) при увеличении $\times 100$.

Оценку цитотоксичности матриц-носителей и их супернатантов при прямом контакте после 24-часовой инкубации через 1 и 7 суток совместного культивирования исследовали с помощью МТТ теста (Sigma-Aldrich, США) [36]. МТТ реагент 5 мг/мл в ФСБ вносили в каждую лунку планшета и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Затем в каждую лунку добавляли диметилсульфоксид

(Serva, Германия) для растворения кристаллов формазана, образовавшихся в результате жизнедеятельности живых клеток, и детектировали окрашенный супернатант при 570 нм на ридере BioTek® ELx 800 (BioTek, США).

Эксперименты проводили в следующих тест-группах, где КМ-МСК человека культивировали совместно со следующими биоорганическими матриксами: (1) «Коллапан», (2) «Остеоматрикс», (3) «Лиостипт», (4) ЛКМ и (5) без образца в ППС с аналогичными концентрациями клеток в качестве контроля. Жизнеспособность КМ-МСК после совместного культивирования с матриксами-носителями и их супернатантами рассчитывали по следующей **формуле (1)**:

$$(\text{ОП}_{\text{опыт}} / \text{ОП}_{\text{контроль}}) \times 100\%$$

Соответственно цитотоксичность носителей и их супернатантов рассчитывали по следующей **формуле (2)**:

$$100\% - (\text{ОП}_{\text{опыт}} / \text{ОП}_{\text{контроль}}) \times 100\%$$

где ОП_{опыт} – оптическая плотность элюатов из лунок с клетками и носителями или супернатантами; ОП_{контроль} – оптическая плотность элюатов из лунок с клетками, культивируемых только в ППС.

Количественные критерии оценки цитотоксичности матриксов-носителей и их супернатантов были следующими: низкая токсичность – гибель до 30% клеток (жизнеспособность выше 70%); средняя токсичность – гибель 30–50% клеток (жизнеспособность 50–70%); высокая токсичность – гибель более 50% клеток (жизнеспособность ниже 50%).

В качестве основы для создания и оценки сложного остеокондуктивного трансплантата на последующих этапах эксперимента выбирали тот биоорганический носитель, который демонстрировал наименьшую цитотоксичность в отношении КМ-МСК.

Оценка экспансии КМ-МСК человека на биоорганическом носителе

В лунки 24-луночного планшета помещали биоорганический носитель с наименьшей выявленной цитотоксичностью. На него высевали КМ-МСК человека первого пассажа при концентрациях инокулята $50,0 \times 10^3$, $100,0 \times 10^3$ и $300,0 \times 10^3$ и культивировали в течение 7 суток в ППС с добавлением и без добавления 5% алПОРФТ. Затем клетки удаляли раствором трипсин-ЭДТА (Sigma-Aldrich, США). Количество жизнеспособных клеток подсчитывали методом исключения трипанового синего в камере Горяева [37].

Оценка остеогенной дифференцировки КМ-МСК человека

КМ-МСК человека после двух пассажей высевали во флаконы T25 (Sarstedt, Германия) по $8000 / \text{см}^2$ для последующей количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализа) в режиме реального времени и чашках Петри диаметром 35 мм для световой микроскопии с окрашиванием красителем. В экспериментах изучали четыре варианта культивирования клеток: КМ-МСК, культивируемые в ППС (контрольный образец); КМ-МСК, культивируемые в ППС с 5% алПОРФТ; КМ-МСК, культивируемые в остеогенной среде (ОС); КМ-МСК, культивируемые в ОС с 5% алПОРФТ.

ОС содержала среду α -МЕМ с добавлением 10% ФТС, 10 мМ β -глицерофосфата (Sigma Aldrich, США), 50 мкг аскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich, США) и 0,1 мкМ дексаметазона (Sigma Aldrich, США) [40]. Дифференцировку КМ-МСК проводили в ОС в течение четырех и семи суток, при этом культуральную среду меняли дважды.

Гены	Прямой праймер 5' – 3'	Обратный праймер 5' – 3'
RUNX2	CACTGGCGGTGCAACAAGA	TTTCATAACAGCGGAGGCATTC
ALP	GGTGAAGGAGGCAGAATTG	TCAGAGTGCTTCCGAGGAG
OSP	CACAGCATCTGGGTATTGTGTG	CGACCAAGGAAACTCACTACC
GapDH	CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT	CCATGGTGCTCTGAGCGATGT

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для ОТ-ПЦР

Table 1. Nucleotide sequences for the RT-qPCR primers

Образцы как остеогенно-индуцированных, так и недифференцированных КМ-МСК культивировали в присутствии алПОРФТ в конечной концентрации 5%.

Оценку остеогенной дифференцировки КМ-МСК человека *in vitro* проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для определения экспрессии мРНК генов RUNX2, ALP и OSP на 4 и 7 день культивирования клеток. Также проводили прижизненную визуализацию остеогенно-индуцированных КМ-МСК человека и оценку *in vitro* минерализации (образования отложений кальция) путем окрашивания по фон Косса на 21 день индукции клеток.

ОТ-ПЦР проводили в несколько этапов [33, 38]. Первоначально осуществляли первичное выделение тотальной РНК из КМ-МСК человека, культивированных во флаконах T25 (Sarstedt, Германия). Экстракцию проводили с использованием реагента TRI Reagent (Sigma Aldrich, США) согласно инструкции производителя. После этого образцы тотальной РНК использовали для получения комплементарной ДНК (кДНК) методом обратной транскрипции. Реакцию проводили в смеси объемом 20 мкл, состоящей из 2 мкг РНК, 5 мкМ Олиго (dT18)-праймер (Thermo Fisher Scientific, США), 1 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфата (dNTP) (Thermo Fisher Scientific, США), 40 ЕД ингибитора РНКазы Ribolok (Thermo Fisher Scientific, США), 1 мкл (200 ед/мл) обратной транскриптазы RevertAid Premium и 5X буфера (Thermo Fisher Scientific, США). Амплификацию проводили в течение 30 мин при 50°C. Обратную транскриптазу инактивировали нагреванием при 85°C в течение 5 мин.

Полученную кДНК амплифицировали согласно следующей программе: 95°C 10 мин (активация полимеразы) с последующей амплификацией в 40 циклов при 60°C в течение 1 мин. Для детекции маркеров остеогенной дифференцировки (RUNX2, ALP и OSP) использовали следующие пары праймеров с соответствующими нуклеотидными последовательностями (**таблица 1**) [39].

Нормировку данных проводили относительно эталонного гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GapDH). ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе CFX96 Touch REAL (Bio-Rad, США). Результаты были обработаны с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager.

Относительную экспрессию генов рассчитывали методом Ливака по следующей **формуле (3)** [40]:

$$\text{Экспрессия генов} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = [Ct (\text{маркерный ген}) - Ct (\text{GapDH})]$$

Формирование остеобластов и их минерализацию оценивали в чашках Петри (Sarstedt, Германия). КМ-МСК окрашивали 1-2% раствором нитрата серебра в течение

45–60 мин под ультрафиолетом, затем промывали дистиллированной водой и фиксировали тиосульфатом натрия в течение 5 мин. Окрашенные клетки затем промывали деионизированной водой, сушили и оценивали с помощью светового микроскопа Leica DM IL LED (Leica Microsystems, Германия) при увеличении $\times 100$. Морфологическая трансформация характеризовалась изменением формы клеток на кубовидную с внутриклеточными отложениями фосфата кальция, окрашенными в черный цвет [41].

Моделирование гибридного клеточно-тканевого трансплантата *in vitro*

При разработке гибридного клеточно-тканевого трансплантата для применения в регенеративной медицине для замещения костных дефектов нами определены его основные компоненты: КМ-МСК человека, предифференцированные в остеогенный фенотип; алПОРФТ. Для моделирования окружающей среды (костной ткани) нами использована аллогенная спонгиоза (операционный материал). Описывали макроскопическую картину, определили абсолютное количество предифференцированных КМ-МСК в составе трансплантата в конце 1, 2 и 3 недели культивирования, оценивали адгезию клеток и их распределение в трансплантате. Для этих целей применяли прижизненное окрашивание клеток флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, США).

Статистическая обработка данных

Данные исследований представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$) в программном обеспечении GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., США). Достоверность различий в вариационных рядах оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента. Различия были достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фенотипическая характеристика КМ-МСК человека

Иммунофенотип КМ-МСК человека 2-пассажа характеризовался экспрессией специфических маркеров CD90⁺ и CD105⁺ и отсутствием маркеров CD34⁺ и CD45⁺. Количество клеток в культуре, экспрессирующих маркер CD90⁺, составило $99,9 \pm 0,14\%$, маркер CD105⁺ – $99,14 \pm 1,23\%$. Выявлено незначительное количество клеток, экспрессирующих маркеры CD34⁺ ($0,45 \pm 0,20\%$) и CD45⁺ ($0,30 \pm 0,07\%$). Культура была стерильной (отсутствовали бактерии и грибы), жизнеспособность полученных клеток никогда не была ниже 90%.

Образцы	Супернатант (% живых клеток)		Матрикс-носитель (% живых клеток)	
	1 день	7 дней	1 день	7 дней
Коллапан	$82,76 \pm 22,35$	$89,03 \pm 15,69$	$87,56 \pm 32,56$	$93,35 \pm 1,56$
Остеоматрикс	$84,25 \pm 10,14$	$91,31 \pm 13,08$	$88,83 \pm 9,89$	$92,32 \pm 10,58$
Лиостипт	$101,72 \pm 4,86$	$124,52 \pm 7,30$	$88,63 \pm 8,47$	$96,55 \pm 10,91$
ЛКМ	$101,44 \pm 12,14$	$80,74 \pm 3,35$	$87,90 \pm 0,55$	$90,85 \pm 9,14$

Таблица 2. Жизнеспособность КМ-МСК человека при культивировании *in vitro* с носителями и их супернатантами при прямом контакте. Данные представлены как $M \pm SEM$

Table 2. Viability of BM-MSCs during cultivation *in vitro* with the carriers and their supernatants in direct contact. Data are expressed as $M \pm SEM$

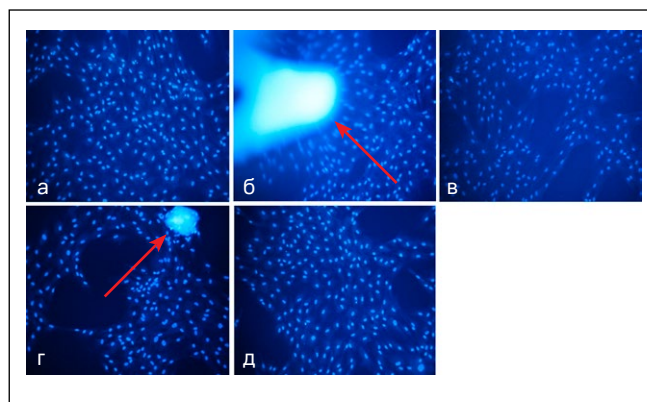


Рисунок 1. Прижизненное окрашивание ядер КМ-МСК человека Hoechst 33342 после 24 часов культивирования с различными носителями: (а) ППС (контроль); (б) Остеоматрикс; (в) ЛКМ; (г) Коллапан; (д) Лиостипт. Изображение увеличено в $\times 100$.

Figure 1. Nuclei labeling of Hoechst 33342 BM-MSCs after one day of cultivation with different carriers: (a) CCM (control sample); (b) Osteomatrix; (c) LBM; (d) Kollapan; (e) Lyostypt. Image taken at 100x magnification.

Биосовместимость биоорганических матриц с КМ-МСК человека

Основным свойством биополимеров и матриц-носителей на их основе при создании трансплантатов для восстановления больших дефектов костной ткани должно быть отсутствие токсического эффекта на остеопрогениторные клетки, а также содействие их прикреплению, пролиферации и остеогенной дифференцировке. Это способствует синтезу клетками нового внеклеточного матрикса на поверхности носителя и его интеграции с нативной костной тканью. Следовательно, носители должны быть биосовместимыми с КМ-МСК, поддерживая клеточную активность и механическую целостность с ними для успешного процесса заживления дефекта костной ткани [11]. Для оценки цитотоксичности матриц-носителей использовали МТТ-тест и прижизненное окрашивание клеток флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, США).

Окрашивание Hoechst 33342 выявило ядра меченых клеток, что подтвердило цитосовместимость и способность адгезии КМ-МСК человека на носителях и их супернатантах при прямом контакте (**рисунок 1**).

На рисунке 1 показано наличие плоских цилиндрических неконденсированных ядер КМ-МСК и образование ими однородного монослоя живых клеток при культивировании с носителями: красные стрелки показывают адгезионную способность последних для клеток.

Результаты экспериментов по цитотоксичности матриц-носителей и их супернатантов при непосредственном контакте с КМ-МСК представлены в **таблице 2**.

При оценке острой цитотоксичности через 24 часа культивирования жизнеспособность клеток колебалась от 82,76% до 100%. Установлено отсутствие цитотоксичности супернатантов биоорганических носителей «Лиостипта» и «ЛКМ» на всех сроках наблюдения в сравнении с контролем. Матрикс-носители показали аналогичный эффект на КМ-МСК клетки. Все четыре изученных носителя обладали незначительной цитотоксичностью, вызывавшей гибель не более 30% клеток (малотоксичные). И только культивирование КМ-МСК с «Лиостиптом» показало наибольшую жизнеспособность клеток при прямом контакте

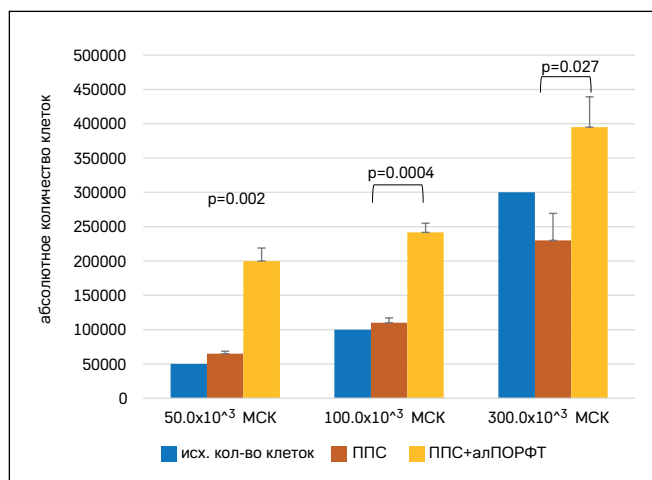


Рисунок 2. Проллиферативная активность различных концентраций КМ-МСК на биоорганическом носителе «Люостипт» в течение 7 суток культивирования *in vitro*.

Figure 2. Proliferative activity of different concentrations of BM-MSCs on the «Lyostypt» bioorganic carrier over a period of 7-d cultivation *in vitro*.

через 24 часа и 7 суток, и даже умеренную пролиферацию клеток с его супернатантом.

Проллиферативная активность КМ-МСК человека на биоорганическом носителе

КМ-МСК являются многообещающими кандидатами для регенеративной медицины при устранении костных дефектов. Однако введение КМ-МСК в очаг повреждения не всегда демонстрирует эффективность из-за миграции клеток с кровью и тканевой жидкостью или введения недостаточного количества клеток. Поэтому

использование в составе гибридного клеточно-тканевого трансплантата биоорганических матричных носителей, способных заселяться клетками и выполнять функцию каркаса для облегчения пластического закрытия дефекта, является актуальной задачей тканевой инженерии [40]. Результаты оценки пролиферативной активности КМ-МСК человека с подбором их оптимальной концентрации для заселения биоорганического матрикса «Люостипт» как носителя с наименьшей цитотоксичностью представлены на рисунке 2.

При культивировании КМ-МСК человека в ППС (рисунок 2) без алПОРФТ к 7 суткам наблюдали незначительную пролиферацию клеток при дозах внесения 50,0x10³ и 100,0x10³ ($p \geq 0,05$) и снижение исходного количества клеток при более высокой дозе внесения – 300,0x10³ клеток ($p \leq 0,05$). При добавлении 5% алПОРФТ к ППС выявили значительное увеличение пролиферативной активности клеток. Так, количество КМ-МСК увеличивалось в 3,3 раза ($p = 0,02$), в 2,6 раза ($p = 0,0004$) и 1,3 раза ($p = 0,026$) к начальной посевной концентрации в 50,0x10³, 100,0x10³ и 300,0x10³ клеток на см² соответственно. Жизнеспособность КМ-МСК была высокой во всех образцах и составила 99% в четырех сериях эксперимента. Таким образом, усиление пролиферативной активности КМ-МСК на носителе было обусловлено присутствием факторов роста, содержащихся в алПОРФТ.

Остеогенная дифференцировка КМ-МСК человека

КМ-МСК обладают значительным потенциалом в регенеративной медицине, например, у пациентов с посттравматическими или послеоперационными повреждениями кости. КМ-МСК способны заменять поврежденные

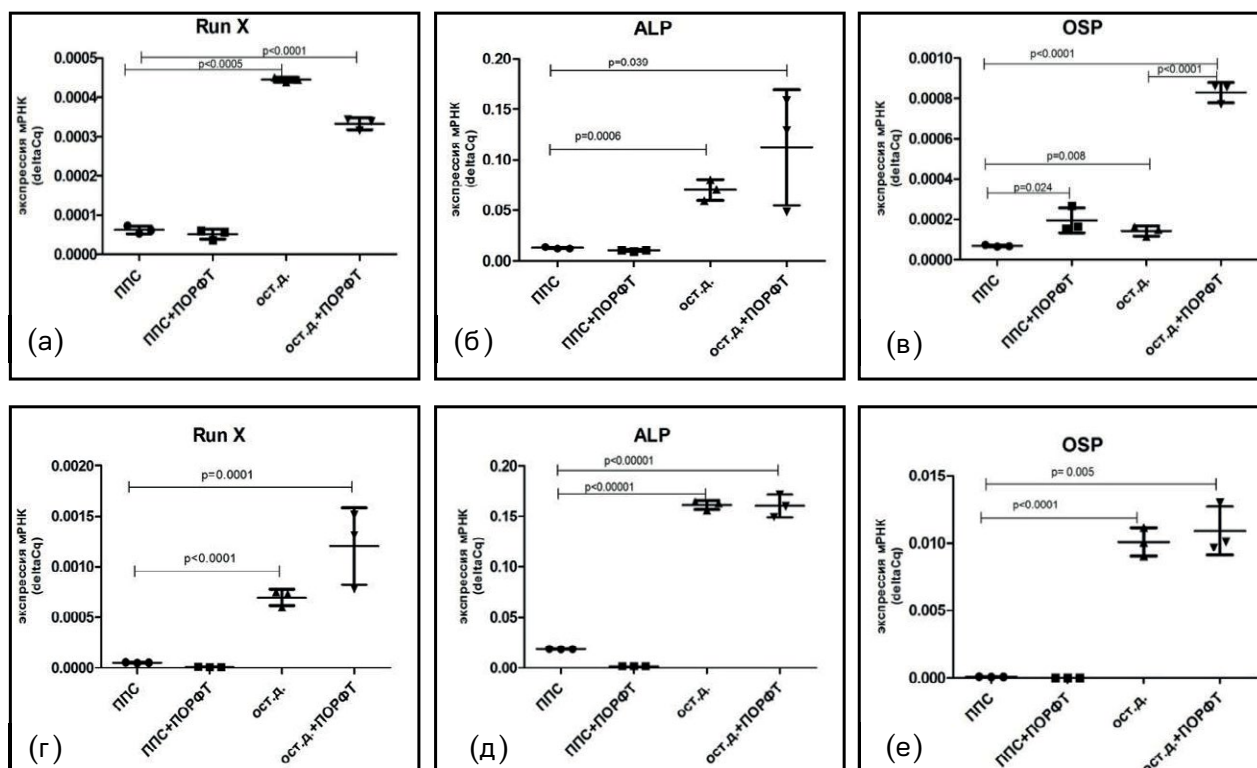


Рисунок 3. Экспрессия мРНК остеогенных генов: (а, г) RunX, (б, д) ALP, (в, е) OSP после 4 (верхний ряд) и 7 (нижний ряд) суток культивирования КМ-МСК. Данные представлены как $M \pm SEM$.

Figure 3. mRNA expression of osteogenic genes: (a, г) RunX, (б, д) ALP, (в, е) OSP after 4 (top row) and 7 (bottom row) days of cultivation BM-MSCs. Data are expressed as $M \pm SEM$.

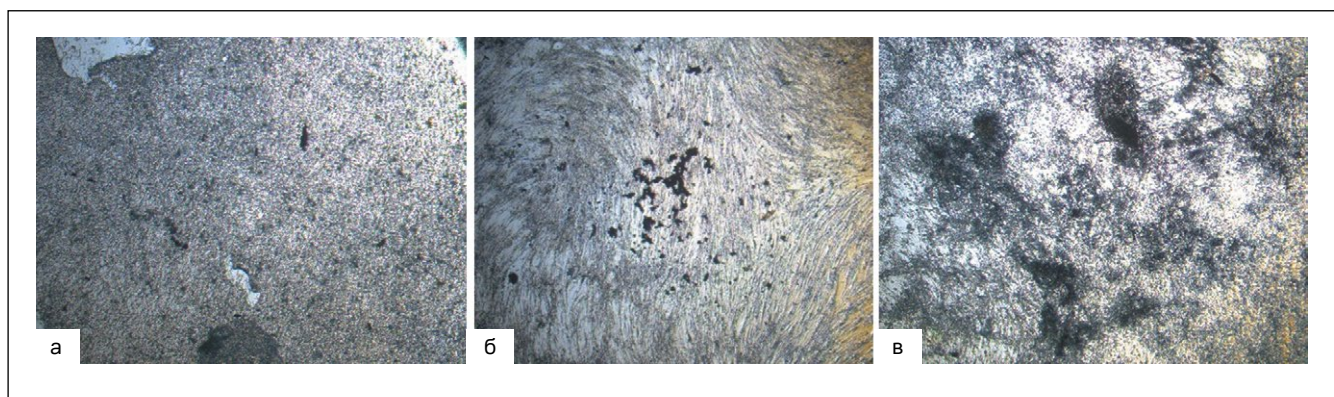


Рисунок 4. Окрашивание фон Косса КМ-МСК человека: (а) клетки, культивированные в ППС; (б) – клетки, культивированные в ОС; (в) – клетки, культивированные в ОС с добавлением 5% алПОРФТ. Изображения сделаны при 100-кратном увеличении.

Figure 4. Von Kossa staining of BM-MSCs: (a) cells cultivated in CCM; (b) cells cultivated in OM; (v) cells cultivated in OM, supplemented with 5% alPRP. Images are taken at 100x magnification.

клетки, дифференцироваться и синтезировать внеклеточный костный матрикс в зоне дефекта. Кроме того, КМ-МСК могут косвенно способствовать восстановлению тканей посредством секреции факторов роста [40]. Исследования L. Meesuk и соавт. (2022) [42] показали, что остеогенно-дифференцированные КМ-МСК могут продуцировать больше остеогенных факторов, чем недифференцированные клетки. Такой подход будет более эффективным при замещении костных дефектов.

В экспериментах *in vitro* остеогенный потенциал клеток определяли по экспрессии молекулярно-генетических маркеров (мРНК остеогенные гены RUNX2, ALP, OSP) методом ОТ-ПЦР в реальном времени и посредством окрашивания монослоя клеток по фон Косса с последующим выявлением в последних оссификатов кальция. Результаты ОТ-ПЦР анализа экспрессии мРНК остеогенных генов (RunX, ALP, OSP) представлены на рисунке 3.

Через 4 дня культивирования КМ-МСК в ОС было выявлено увеличение экспрессии маркерных генов остеогенно-индуцированными клетками. Синтез мРНК гена RunX (рисунок 3а), ALP (рисунок 3б) и OSP (рисунок 3в) увеличился в 7,1 раза ($p = 0,001$), 5,5 раза ($p = 0,001$) и 2,1 раза ($p = 0,008$) соответственно по отношению к недифференцированным КМ-МСК, культивируемым в ППС. Добавление 5% алПОРФТ в ОС при дифференцировке КМ-МСК увеличило экспрессию гена OSP в 12,0 раз ($p = 0,0001$) по отношению к

недифференцированным клеткам, культивируемым в ППС, и в 5,9 раза ($p < 0,0001$) – к остеогенно-индуцированным КМ-МСК, культивируемым в ОС без алПОРФТ. Представленные различия статистически значимы.

По истечении 7 дней культивирования клетки в ОС продолжали увеличивать экспрессию генов RunX (рисунок 3г), ALP (рисунок 3д) и OSP (рисунок 3е). Статистически достоверные результаты получены по росту экспрессии следующих генов: ALP – рост в 8,67 раза ($p < 0,0001$) и OSP – в 22,9 раза ($p < 0,0001$) соответственно по отношению к недифференцированным КМ-МСК, культивируемым в ППС. Различия статистически значимы. В то же время добавление 5% алПОРФТ в ОС при дифференцировке КМ-МСК на данном сроке не приводило к достоверному увеличению экспрессии генов в сравнении с остеогенно-индуцированными КМ-МСК, культивируемыми в ОС без алПОРФТ. Синтез мРНК генов оставался на сопоставимом уровне ($p \geq 0,05$).

Таким образом, культивирование в ОС достоверно способствует увеличению экспрессии клетками генов RunX и, следовательно, остеогенной дифференцировке КМ-МСК. При этом добавление алПОРФТ в ОС достоверно усиливает экспрессию генов и остеогенную дифференцировку КМ-МСК человека на начальном этапе (до 7 суток культивирования).

В период с 4 до 7 сутки культивирования в ОС (в том числе с добавлением алПОРФТ) происходит предифференцировка КМ-МСК. В этот срок клетки начинают экспрессировать остеогенные маркеры, но при этом отложения кальция в них еще не формируется. Через 21 день остеогенной дифференцировки было показано, что морфология КМ-МСК изменилась с веретенообразной на кубовидную. После окрашивания образцов дифференцированных клеток нитратом серебра по фон Косса дополнительно обнаружены внутриклеточные отложения фосфата кальция (окрашены в черный цвет). Изменения были максимально выражены в клетках, культивируемых в ОС с добавлением 5% алПОРФТ (рисунок 4).

Моделирование гибридного клеточно-тканевого трансплантата *in vitro*

Результаты совместного культивирования компонентов гибридного клеточно-тканевого трансплантата в условиях требуемого микроокружения (костная ткань) *in vitro* представлены на рисунке 5.

По итогам инкубации всех компонентов трансплантата *in vitro* к концу первой недели отмечены плотный контакт элементов аллогенной спонгиозы и матриксного носителя

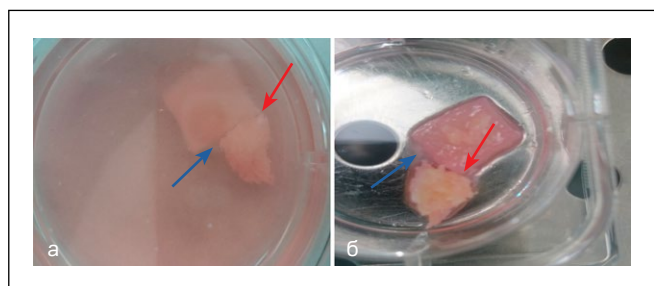


Рисунок 5. Совместное культивирование компонентов трансплантата *in vitro*: (а) 1 неделя, (б) 3 неделя. Изображения сделаны при 50-кратном увеличении.

Figure 5. Co-cultivation of graft components *in vitro*: (a) one week, (б) three weeks. Image taken at 50x magnification.

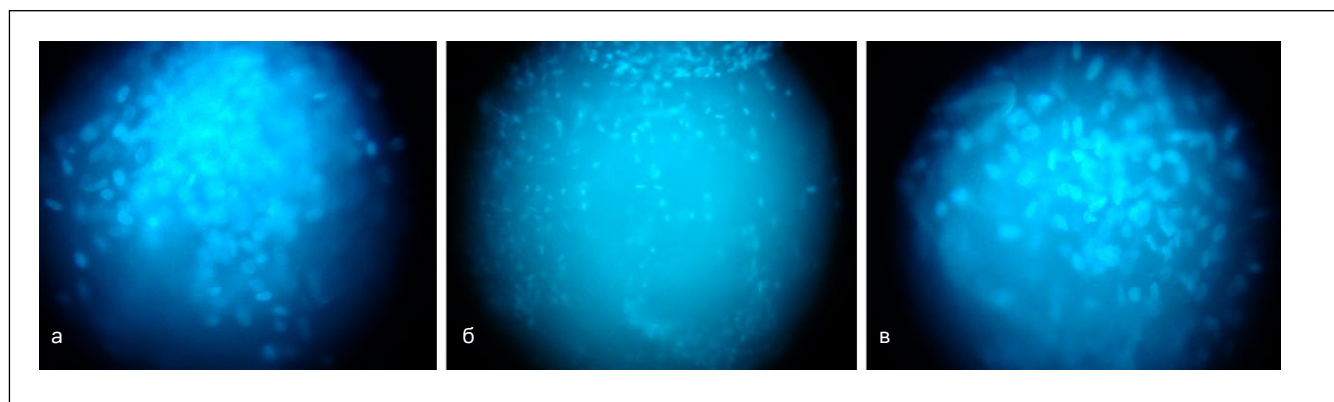


Рисунок 6. Прижизненное окрашивание красителем Hoechst 33342 остеогенно предифференцированных КМ-МСК при моделировании трансплантата *in vitro*. Изображения сделаны при 100-кратном увеличении: а) одна неделя, б) две недели, в) три недели.

Figure 6. Live labeling of Hoechst 33342 of osteogenically predifferentiated BM-MSCs in vitro graft modeling: (a) one week, (б) two weeks, (в) three weeks. Images are taken at 100x magnification.

«Лиостипт», а также формирование гелеподобного микроокружения (синяя стрелка), представленного элементами алПОРФТ. К концу третьей недели отмечено нахождение всех компонентов трансплантата в плотной гелеподобной среде и тесное взаимодействие фрагментов аллогенной спонгиозы с матриксным носителем посредством образованного монослоя клеток в виде тяжа КМ-МСК (красная стрелка).

Следующим этапом определили абсолютное количество остеогенно предифференцированных КМ-МСК в составе гибридного трансплантата в конце 1, 2 и 3 недели инкубирования *in vitro* (таблица 3).

Как видно из представленных в таблице результатов, в первые две недели инкубирования не было отмечено значительного уменьшения остеогенно предифференцированных КМ-МСК в составе трансплантата. С увеличением срока культивирования до трех недель количество клеток уменьшилось по отношению к изначально высеванному количеству в связи с плотным распределением последних между коллагеновых волокон матриксного носителя. Часть клеток мигрировала в аллогенную спонгиозу и формировала плотный монослой между костью и носителем.

При окрашивании флуоресцентным красителем Hoechst 33342 показаны равномерное заселение биополимерной коллагеной губки остеогенно предифференцированными КМ-МСК и высокая жизнеспособность клеток среди коллагеновых волокон матриксного носителя на всех сроках культивирования (рисунок 6).

Переходя к обсуждению полученных результатов стоит отметить, что аллогенные костные импланты являются

Образец	1 неделя (х тыс. клеток)	2 неделя (х тыс. клеток)	3 неделя (х тыс. клеток)
Гибридный трансплантат	557,5 ± 24,75	530,0 ± 49,50	380,0 ± 7,07

Таблица 3. Проллиферативная активность остеогенно предифференцированных КМ-МСК в составе трансплантата *in vitro*

Table 3. Proliferative activity of osteogenically predifferentiated BM-MSCs in graft *in vitro*

распространенным и эффективным подходом в замещении костных дефектов. Новые методы тканевой инженерии и клеточных технологий способны придать этому направлению второе дыхание и найти применение в замещении долго незаживающих костных дефектов, когда бесклеточные остеоиндуктивные импланты или МСК без матриксных носителей не могут быть эффективными [19, 43]. В подобных ситуациях тканевая инженерия с использованием биоорганических матриксных носителей, или скаффолдов, остеогенных клеток и факторов, способствующих регенерации и васкуляризации трансплантатов, представляет практический интерес для лечения повреждений или замещения дефектов костей [19, 44]. При этом КМ-МСК чаще других клеток используются для создания гибридных клеточно-тканевых трансплантатов, поскольку данные клетки хорошо охарактеризованы, легко доступны и демонстрируют огромный остеогенный потенциал. Тем не менее клиническая эффективность подобного трансплантата существенно зависит от количества засеянных клеток на носитель, или скаффолд, биосовместимости последнего и других факторов [43–45].

В регенеративной медицине костной ткани применяются различные биоорганические носители, поэтому жизнеспособность, адгезия и пролиферация КМ-МСК на матриксе будут зависеть от химической природы и структуры последнего [11, 46]. В нашем исследовании мы изучали цитотоксичность четырех коммерческих биоорганических носителей на основе коллагена («Лиостипт»), гидроксиапатита/коллагена («Коллапан»), костного матрикса с sGAGs («Остеоматрикс») и лиофилизированного костного матрикса («ЛКМ»), анализируя жизнеспособность КМ-МСК при их совместном культивировании. Все четыре исследованных матриксных носителя обладали низкой цитотоксичностью, вызывающей гибель не более 30% клеток. Однако коллагеновая губка «Лиостипт» показала наименьшую цитотоксичность и наибольшую биосовместимость с КМ-МСК человека, что создавало оптимальные условия для пролиферации клеток на матриксе. Поэтому мы использовали «Лиостипт» в качестве основы (матрикса) для создания гибридного клеточно-тканевого остеокондуктивного трансплантата, состоящего из непосредственно носителя для клеток, остеогенно предифференцированных КМ-МСК и факторов алПОРФТ с последующей оценкой пролиферативной активности и остеогенной дифференцировки клеток. В экспериментах J. Zheng и соавт. (2022) также показали, что культивирование МСК человека на

коллагеновой губке с гидрогелем способствовало их пролиферации и усиливало хондрогенную дифференцировку вследствие образования аналога внеклеточного микроокружения [47].

Научные данные свидетельствуют о противоречивых результатах влияния растворимых отдельных факторов (лизатов, релизатов тромбоцитов) и плазмы, обогащенной тромбоцитами, на дифференцировку МСК человека. Так, использование плазмы, обогащенной факторами тромбоцитов, показало положительный эффект на насыщенность матриц (β-трикальцийфосфат, кальций-дефицитный гидроксипатит) МСК и на пролиферацию МСК в этих матриксах, но оказывало незначительное воздействие на остеогенный потенциал МСК [48].

Таким образом, характерной чертой современной тканевой инженерии и регенеративной медицины является комбинирование матриц с различными биологически активными компонентами и насыщение их клетками, преимущественно МСК, с последующей направленной дифференцировкой последних. Ранее [49, 50], а также в настоящем исследовании было показано, что производные тромбоцитов (лизат и релизат тромбоцитов, алПОРФТ) являются эффективными компонентами для стимулирования экспансии и остеогенной дифференцировки КМ-МСК *in vitro*. Такой подход позволяет получить достаточное количество клеток для создания гибридного клеточно-тканевого трансплантата с последующим его использованием для замещения костных дефектов. При этом состав конструкции в варианте биоорганического матричного носителя на коллагеновой

основе, остеогенно предифференцированных КМ-МСК и факторов алПОРФТ является оптимальным для потенциального клинического применения.

■ ВЫВОДЫ

1. Исследуемые на биосовместимость с культурой КМ-МСК человека биоорганические матриксы показали низкую токсичность *in vitro* в отношении клеток (не более 30%). При увеличении срока культивирования КМ-МСК с биоматериалами до 7 суток клетки сохраняли высокую жизнеспособность и увеличивали свою пролиферативную активность. Наименьшую цитотоксичность и, соответственно, наилучшую биосовместимость показал носитель из резорбируемой биополимерной коллагеновой губки.

2. Биологические и структурные характеристики коллагенового матрикса носителя достоверно способствовали адгезии КМ-МСК, их равномерному распределению и пролиферации.

3. Применяемая в качестве источника растворимых факторов алПОРФТ оказывала влияние на остеогенную дифференцировку КМ-МСК человека – добавление 5% алПОРФТ в остеогенную среду достоверно ускоряло процесс минерализации (отложение солей кальция в матриксе клеток) и экспрессию генов остеогенной дифференцировки (RUNX2, ALP и OSP).

4. Гибридный клеточно-тканевый трансплантат характеризуется безопасностью, эффективностью и биосовместимостью с костной тканью, что делает его пригодным для клинического применения в регенеративной медицине при замещении дефектов кости. ■

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ	ADDITIONAL INFORMATION
Соблюдение этических норм. От участников исследования получено информированное согласие по решению этического комитета Республиканского научно-практического центра травматологии и ортопедии Министерства здравоохранения Республики Беларусь (протокол №3 от 14.04.2021 г.).	Compliance with ethical standards. Informed consent was obtained from the study participants in accordance with the decision of the Ethics Committee of the Republican Scientific and Practical Center for Traumatology and Orthopedics of the Ministry of Health of the Republic of Belarus (protocol No. 3 dated 04/14/2021).
Источник финансирования. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.	Study funding. This research received no external funding.
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.	Conflict of interest. The authors declare that there are no obvious or potential conflicts of interest associated with the content of this article.
Участие авторов. Н.Н. Данилкович – проведение исследования, подготовка рукописи. С.М. Космачева – концепция, методология и дизайн исследования. А.Г. Ионова – проведение исследования, сбор данных. К.А. Криворот – проведение исследования, сбор данных. А.Н. Мазуренко – обработка данных, визуализация. Д.Г. Алексеев – редактирование рукописи. Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.	Contribution of individual authors. N.N. Danilkovich – investigation, writing-original draft preparation. S.M. Kosmacheva – conceptualization, methodology and study design; A.G. Ionova – investigation, data curation; K.A. Krivorot – investigation, data curation. A.N. Mazurenko – data analysis, visualization. D.G. Alekseev – article review and editing. All authors gave their final approval of the manuscript for submission, and agreed to be accountable for all aspects of the work, implying proper study and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kosmacheva SM, Danilkovich NN, Shchepen AV, et al. Effect of platelet release on osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Bull Exp Biol Med*. 2014;156(4):560-5.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2396-1>
2. Deev RV, Isaev AA, Kochish AY, Tikhilov RM. Pathways for the development of cell technologies in bone surgery. *Traumatology and orthopedics in Russia*. 2008;47(1):65-75. (In Russ.). [Деев Р.В., Исаев А.А., Кочиш А.Ю., Тихилов Р.М. Пути развития клеточных технологий в костной хирургии. *Травматология и ортопедия в России*. 2008;47(1):65-75].
URL: <file:///C:/Users/Persona/Downloads/puti-razvitiya-kletochnyh-tehnologiy-v-kostnoy-hirurgii.pdf>
3. Szpalski C, Sagebin F, Barbaro M, Warren SM. The influence of environmental factors on bone tissue engineering. *Tissue Engineering Part B*. 2012;18(4):258-269.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32849>
4. Wang W, Yeung KWK. Bone graft substitutes for bone defect repair: a review. *Bioactive Materials*. 2017;2:224-247.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
5. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick J. Scaffold design for bone regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014;14(1):15-56.
DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>
6. Makarevich S, Mazurenko A, Krivorot K, et al. The use of autologous mesenchymal stem cells for the purpose of spinal fusion. *Science and innovation*. 2019;11:79-84. (In Russ.). [Макаревич С., Мазуренко А., Криворот К. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток с целью спондилодеза. *Наука и инновации*. 2019;11:79-84].
DOI: <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2019-11-79-84>
7. Lagenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Therapy*. 2013;4(5):117.
DOI: <https://doi.org/10.1186/scri328>
8. Hutchings G, Moncrieff L, Dompe C, et al. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells; from basic knowledge, animal models to clinical trials. *J Clin Med*. 2020;9(1):139.
DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm9010139>
9. Steinert AF, Rackwitz L, Gilbert F, et al. The clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives. *Stem Cells Trans Med*. 2012;1(3):237-247.
DOI: <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0036>
10. Correia C, Grayson WL, Park M, et al. In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. *PLOS One*. 2011;6(12):e28352.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028352>
11. Filippi M, Born G, Chaaban M, Scherberich A. Natural polymeric scaffolds in bone regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:1-28.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00474>
12. Ripamonti, U. Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primate. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2001;107:977-988.
DOI: <https://doi.org/10.1097/00006534-200104010-00012>
13. Zhukova Y, Hiepen Ch, Knaus P, et al. The role of titanium surface nanostructuring on preosteoblast morphology, adhesion, and migration. *Advanced Healthcare Materials*. 2017;6(15):1-13.
DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.201601244>
14. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2012;29(1):1-63.
DOI: <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v29.i1.10>
15. Seeherman H, Wozney J, Lee R. Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine*. 2002;27:16-23.
DOI: <https://doi.org/10.1097/00007632-200208151-00005>
16. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick J. Scaffold design for bone regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014;14(1):15-56.
DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>
17. Oliveira JF, Aguiar PF, Rossi AM, Soares GA. Effect of process parameters on the characteristics of porous calcium phosphate ceramics for bone tissue scaffolds. *Artificial Organs* 2003;27:406-411.
DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.2003.07247.x>
18. Krut MC, Gaalen SM, Oner FC, et al. Bone tissue engineering and spinal fusion: the potential of hybrid constructs by combining osteoprogenitor cells and scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25:1463-1473.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00490-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00490-3)
19. Neman J, Hambrecht A, Cadry C, Jandal R. Stem cell-mediated osteogenesis: therapeutic potential for bone tissue engineering. *Biologics: Targets and Therapy*. 2012;6:47-57.
DOI: <https://doi.org/10.2147/BTT.S22407>
20. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, et al. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone*. 2007;40(2):522-528.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.019>
21. Tsiklin LI, Pugachev EI, Kolsanov AV, et al. Biopolymer material from human spongiosa for regenerative medicine application. *Polymers*. 2022;14(5):941-953.
DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14050941>
22. Kim HN, Jiao A, Hwang AS, et al. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013;65:536-558.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.014>
23. Thuraiarajah K, Broadhead LM, Balogh ZJ. Trauma and stem cells: biology and potential therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Science*. 2017;18:577-595.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18030577>
24. Armiento AR, Hatt PhL, Rosenberg GS, et al. Functional biomaterials for bone regeneration: a lesson in complex biology. *Advanced Functional Materials*. 2020;30(44):1-41.
DOI: <https://doi.org/10.1002/adfm.201909874>
25. Paladini F, Pollini M. Novel approaches and biomaterials for bone tissue engineering: a focus on silk fibroin. *Materials*. 2022;15(19):1-22.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ma15196952>
26. Potapnev MP, Arabey AA, Kondratenko GG, et al. A soluble platelet-derived growth factors and regenerative medicine. *Healthcare*. 2014;9:32-40. (In Russ.). [Потапнев М.П., Арабей А.А., Кондратенко Г.Г., и др. Растворимые факторы тромбоцитов и регенеративная медицина. *Здравоохранение*. 2014;9:32-40].
27. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod*. 1998;85 (6):538-46.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90029-4](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90029-4)
28. Laquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, et al. Innovative biomaterials for bone regrowth. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):618.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20030618>
29. Kotelnikov GP, Kolsanov AV, Volova LT, et al. Technology of manufacturing of personalized reconstructive allogenic bone graft. *Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2019;3:65-72. [Котельников Г.П., Колсанов А.В., Волова Л.Т., и др. Технология производства персонализированного реконструктивного аллогенного костного имплантата. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2019;(3):65-72].
DOI: <https://doi.org/10.17116/hirurgia201903165>

30. Tsiklin IL, Shabunin AV, Kolsanov AV, Volova LT. In Vivo Bone Tissue Engineering Strategies: Advances and Prospects. *Polymers*. 2022;14(15):3222.
DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14153222>
31. World Health Organization. Blood Transfusion Safety Team. (2001). The Clinical use of blood: handbook.
Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42396> (accessed on 25 August 2023).
32. Pierce J, Benedetti E, Preslar A, et al. Comparative analyses of industrial-scale human platelet lysate preparations. *Transfusion*. 2017;57(12):2858-2869.
DOI: <https://doi.org/10.1111/trf.14324>
33. Shakhbazov AV, Goncharova NV, Kosmacheva SM, et al. Plasticity of human mesenchymal stem cell phenotype and expression profile under neurogenic conditions. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine (Cell Technologies in Biology and Medicine)*. 2009;147(4):513-516.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0547-6>
34. Chen X, Huang J, Wu J. Human mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*. 2022;55:1-11.
DOI: <https://doi.org/10.1111/cpr.13141>
35. Schendzielorz P, Froelich K, Rak K, et al. Labeling adipose-derived stem cells with Hoechst 33342: usability and effects on differentiation potential and DNA damage. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6549347.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/6549347>
36. Danilkovich NN, Derkachev VS, Kosmacheva SM, Potapnev MP. Application of bone-marrow mesenchymal stem cells and platelet-derived growth factors for human osteogenic graft engineering, 5th International conference on Tissue engineering and Regenerative Medicine, Berlin, Germany, 12-14 September, 2016:155.
DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7552.C1.025>
37. Santos VH, Hubbe Pfeifer JP, Souza BJ, et al. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. *BMS Veterinary Research*. 2018;14(1):1-10.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1425-0>
38. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials*. 2010;31:270-278.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.043>
39. Kuvyrkov EV, Severin IN, Belyasova NA. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *News of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2015;2:89-91. [Кувырков Е.В., Северин И.Н., Белясова Н.А. Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі*. 2015;2:89-91].
URL: <file:///C:/Users/Persona/Downloads/255-253-1-PB.pdf>
40. Szustak M, Gendaszewska-Darmach E. Extracellular nucleotides selectively induce migration of chondrocytes and expression of type II Collagen. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5227.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21155227>
41. Zhang D, Yi C, Qi S, Yao X, Yang M. Effects of Carbon Nanotubes on the Proliferation and Differentiation of Primary Osteoblasts. *Methods in Molecular Biology*. 2010;625:41-53.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-579-8_5
42. Meesuk L, Suwanprateeb J, Thammarakcharoen F, et al. Osteogenic differentiation and proliferation potentials of human bone marrow and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. *Scientific Reports*. 2022;12:1-19.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24160-2>
43. Janicki P, Boeuf S, Steck E, et al. Prediction of in vivo bone forming potency of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *European Cells and Materials*. 2011;21:488-507.
DOI: <https://doi.org/10.22203/ecm.v021a37>
44. Yoon Y, Khan IU, Choi KU, et al. Different bone healing effects of undifferentiated and osteogenic differentiated mesenchymal stromal cell sheets in canine radial fracture model. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018;15(1):115-124.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13770-017-0092-8>
45. Kuk M, Kim Y, Lee SH, et al. Osteogenic ability of canine adipose-derived mesenchymal stromal cell sheets in relation to culture time. *Cell Transplantation*. 2015;25(7):1415-1422.
DOI: <https://doi.org/10.3727/096368915X689532>
46. Szpalski C, Barbaro M, Sagebin F, Warren SM. Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques – Part II: Cell Types. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2012;14(4):258-269.
DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0440>
47. Zheng J, Xie Y, Yoshitomi T, et al. Stepwise Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Collagen Sponges under different Microenvironments. *International Journal of Molecular Science*. 2022;23(12):6406.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23126406>
48. Kasten P, Vogel J, Beyen I, et al. Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference. *Journal of Biomaterials Applications*. 2008;23(2):169-188.
DOI: <https://doi.org/10.1177/0885328207088269>
49. Kocaoemer A, Kern S, Kluter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007;25:1270-1278.
DOI: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0627>
50. Borzini P, Mazzucco L. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion*. 2005;45:1759-1767.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00600.x>