

УДК 615.46, 57.086.862

*И.К. Норкин<sup>1</sup>, К.А. Юрова<sup>1</sup>, О.Г. Хазиахматова<sup>1</sup>, В.В. Малащенко<sup>1</sup>,  
Д.Д. Лигатюк<sup>1</sup>, И.А. Хлусов<sup>2</sup>, Л.С. Литвинова<sup>1</sup>*

## ЭФФЕКТЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ДОЗ ГЕПАРИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ММСК ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

<sup>1</sup> Центр иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. И. Канта, г. Калининград, Российская Федерация;

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ), г. Томск, Российская Федерация

**Резюме.** Применение искусственных материалов в регенеративной медицине сопровождается развитием воспалительной реакции и инициацией коагуляционного гемостаза из-за контакта имплантата с мягкими тканями организма. Все это приводит к образованию тромбозов крупных и магистральных артерий и развитию серьезных осложнений. Для предотвращения развития послеоперационных патологических состояний, вызванных гиперкоагуляционным синдромом, используют классические терапевтические стратегии с применением антикоагулянтов (преимущественно, гепарина). Однако описанная тактика лечения приводит к нарушению процессов миграции и адгезии мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), что негативно влияет на формирование костной мозоли и процессы остеointegrации имплантата. **Цель исследования** — изучить влияние взвеси наночастиц ГАП в присутствии гепарина в градиенте терапевтических концентраций, на миграционную и пролиферативную активность ММСК жировой ткани человека в условиях культивирования *in vitro*. **Материалы и методы.** Для оценки миграционного и пролиферативного потенциала ММСК в присутствии нановзвеси ГАП и/или терапевтических доз (0,5–1 МЕ/мл) гепарина использовалась электродная система непрерывного наблюдения — xCELLigence® RTCA DP. **Результаты.** Выявлено достоверное снижение миграционной активности и пролиферативного потенциала ММСК в условиях их сокультивирования с нановзвесью ГАП в присутствии/отсутствии гепарина (0,5–1 МЕ/мл). **Заключение.** Результаты исследования могут служить предпосылкой для разработки новых терапевтических подходов применения гепарина у пациентов хирургического профиля с высоким риском развития послеоперационных тромбозов после проведения операций остеосинтеза.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, гепарин, имплантат, RTCA, миграция, *in vitro*

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Норкин Игорь Константинович

norkin\_igor@mail.ru

Дата поступления 26.07.2022 г.

Образец цитирования:

Норкин И.К., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Лигатюк Д.Д., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Эффекты терапевтических доз гепарина на функциональную активность ММСК при моделировании механизмов остеointegrации в условиях культивирования *in vitro*. Вестник уральской медицинской академической науки. 2022, Том 19, №3, с. 231–240, DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-231-240

## Введение

Использование искусственных медицинских материалов в регенеративной медицине сопровождается развитием воспалительного очага на границе с мягкими тканями организма. Локальное воспаление является необходимым этапом эффективной регенерации поврежденной костной ткани [7]. При контакте имплантируемого медицинского изделия с мягкими тканями пациента наблюдается адсорбция белков крови и интерстициальных жидкостей, что активирует систему комплемента и инициирует коагуляционный гемостаз, что, в конечном итоге, приводит к образованию на поверхности имплантата фибринового сгустка, необходимого для формирования костной мозоли [5].

Внеклеточный матрикс на основе фибрина, коллагена и эластина обеспечивает основу для формирования костного регенерата путем миграции и адгезии ММСК к формирующейся костной мозоли [1].

Патологические послеоперационные состояния (тромбозы, тромбоэмболии, инсульты и т.д.), вызванные гиперкоагуляционным синдромом, являются частыми осложнениями у пациентов хирургического профиля [3]. Для предотвращения их появления в послеоперационном периоде используют терапевтические стратегии с применением антитромботических средств, в частности, прямых антикоагулянтов; наиболее широко используемый среди них — нефракционированный гепарин (НФГ) [2].

Важно отметить, что использование гепарина (НФГ) ограничивает нормальное образование фибринового сгустка *in vivo*, что замедляет миграцию и адгезию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) и нарушает процессы формирования костной мозоли, в связи с чем процессы остеоинтеграции имплантата и регенерации поврежденной костной ткани могут быть нарушены. Ранее нами было продемонстрировано увеличение миграционной активности ММСК в присутствии гепарина в токсических дозах [9]. Однако, эффекты диапазона терапевтических доз НФГ на процессы миграции и пролиферации до сих пор остаются не изученными.

**Цель исследования** — оценить эффекты гепарина в диапазоне терапевтических концентраций (0,5; 0,75; 1 МЕ/мл) в присутствии нановзвеси гидроксиапатита (ГАП) на функциональную активность (миграция, пролиферация) ММСК жировой ткани человека в условиях культивирования *in vitro*.

## Материалы и методы

ММСК были выделены из липоаспирата человека согласно Разрешению № 7 от 09.12.2015 локального этического комитета Инновационного парка БФУ имени И. Канта. Выделенная культура соответствовала минимальным критериям, предъявляемым к ММСК: адгезия к поверхности культурального пластика; экспрессия CD105, CD73 и CD90 на клеточной поверхности в сочетании с минимальной экспрессией (<2%) CD45/CD34; способность к дифференцировке в трех направлениях (остео-, адипо- и хондрогенном) [11].

Оценка миграционного и пролиферативного потенциала ММСК проводилась с использованием электродной системы непрерывного наблюдения (real-time cell analysis) — xCELLigence® RTCA DP («ACEA Biosciences Inc.», США). Для оценки миграции использовался 16-луночный СИМ-планшет, представляющий собой систему 2 полостей, разделенных мембраной. Вследствие малого объема нижней камеры (не более 162 мкл) система RTCA не позволяет изучать объемные образцы. В связи с этим в нижнюю камеру помещали нанодисперсию ГАП с диаметром частиц 10–30 нм и в концентрации 1 мг/мл в полной питательной среде (ППС) для формирования условий, соответствующих 3D-модели, используемой в цикле работ согласно дизайну эксперимента. Нанопорошок изготовлен механохимическим методом в Институте химии твердого тела и механохимии СО РАН (Новосибирск). Перед тестированием биологической активности изготовленные образцы и нанопорошок ГАП стерилизовали в сухожаровом шкафу (Sanyo, Япония) при 160°C в течение 1 часа.

Живые, прилипающие ММСК не контактируют напрямую с наночастицами ГАП, осаждаемыми на дно нижних микролунок. Импеданс, снятый с этих электродов СИМ-планшета, показывает площадь, занятую клетками в момент времени, которая напрямую зависит от скорости их миграции (инвазии) через микропоры диаметром 8 мкм, что помогает отслеживать их миграцию в определенное время, выраженную в индексе клеточной миграции (ИКМ). Сигналы для определения ИКМ

с помощью программного обеспечения RTCA Software фиксировали каждые 15 мин в течение 92 ч. По истечению 22 часов от начала эксперимента в лунки был добавлен гепарин в соответствии с дизайном исследования (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл).

Для оценки пролиферативного потенциала использовался 16-луночный E-планшет. В лунки, в соответствии с дизайном эксперимента, добавлялись клетки, гепарин (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл) и взвесь наночастиц ГАП в концентрации 1 мг/мл. ММСК напрямую контактировали с наночастицами ГАП. Детекция клеточного импеданса (индекса) осуществляется посредством контакта электродов и исследуемых клеток на дне лунки планшета. Величина этого импеданса зависит от количества клеток, их размера и формы, а также качества прикрепления клеток к субстрату.

В эксперименте изучали 8 групп: контрольная группа клеток без гепарина и имплантатов (2D-контроль); 2D-модель культивирования клеток с гепарином в диапазоне терапевтической концентрации (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл); клетки с имплантатом (3D-контроль); 3D-модель культивирования клеток с имплантатом и гепарином (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл). ММСК культивировали в ППС (90% DMEM/F12 (1:1) («GibcoLifeTechnologies», США), 10% FBS («SigmaAldrich», США), 50 мг/л гентамицина («Invitrogen», Великобритания), 280 мг/л L-глутамин («SigmaAldrich», США) при температуре 37°C, 100% влажности в атмосфере CO<sub>2</sub> 5%.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью методов статистического описания, а также методов проверки статистических гипотез. Проверку выборки на нормальность проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Данные не подчинялись нормальному закону распределения, в связи чем были определены медиана (M), 25%-ный (Q<sub>1</sub>) и 75%-ный (Q<sub>3</sub>) квартили для описательной статистики. Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрический критерий Краскела-Уоллиса для независимых выборок и множественного сравнения, применяя критерий Данна, и критерий Вилкоксона для зависимых выборок. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Статистический анализ результатов был проведен с использованием пакета программ GraphPadPrismversion 8.0.1 (GraphPadSoftwareInc, SanDiego, CA, USA).

## Результаты

Результаты миграционной активности ММСК в присутствии гепарина (0,5; 0,75; 1 МЕ/мл) и/или взвеси наночастиц ГАП представлены на рисунке 1. График миграции представляет собой логарифмическую кривую, описывающую динамику миграции ММСК через пористую мембрану планшета CIM-plate, имитирующую стенки кровеносных капилляров с высокой аппроксимацией ( $R^2=0,93$ ). Кривые, отражающие динамику миграции (инвазии) клеток через пористую мембрану, построены с помощью системы xCELLigence и визуально могут быть разбиты на 2 участка: Фаза 1 — (0–8 часов) фаза линейного роста; Фаза 2 — (8–92 часов) фаза логарифмического роста с постепенным насыщением показателей индекса клеточной миграции. Среднее время выхода логарифмической кривой на плато составило 8 часов (до добавления гепарина). Мы предположили связь первой фазы индекса клеточной миграции (ИКМ) с инвазией ММСК из верхней камеры в нижнюю через микропоры полимерной мембраны, что имитирует миграцию подвижных клеток из кровеносного русла в ткани. Вторая фаза может быть обусловлена распластыванием ММСК на поверхности электродов.

Данные на рис. 1 показывают первоначальное резкое увеличение ИКМ во всех группах исследования из-за быстрой инвазивной миграции клеток в течение первых 8 часов. Спустя 8 часов от начала эксперимента клеточность в нижней камере входит в фазу логарифмического роста, связанную с замедлением скорости прироста ИКМ. После добавления гепарина в лунки планшета ИКМ резко увеличивался в первый час во всех группах исследования, кроме 3D-модели культивирования с гепарином в концентрации 1 МЕ/мл. ИКМ в этой группе исследования был статистически значимо ниже, чем в 2D-модели культивирования с гепарином в концентрации 0,75 МЕ/мл ( $p < 0,05$ ). Затем наблюдалось снижение миграционной активности ММСК во всех исследуемых группах, переходящее в фазу логарифмического роста ИКМ через 30 часов от начала эксперимента.

Моделирование капиллярного хемотаксиса ММСК в зону регенерации костной ткани позволило получить интересные результаты по истечению 60 часов от начала эксперимента. Присутствие наночастиц ГАП (1 мг/мл) в среде культивирования без прямого контакта с ММСК достоверно (в 2,3

раза,  $p < 0,05$ ) снижало скорость клеточной инвазии из верхней камеры в нижнюю лунку системы RTCA в 3D-модели культивирования с гепарином (1 МЕ/мл), относительно 2D-контрольной группы и 2D-моделей культивирования с гепарином (0,75 и 1 МЕ/мл) (рис.1).

По истечении 92 часов культивирования в 3D-модели в присутствии гепарина (1 МЕ/мл) наблюдалось статистически значимое снижение ИКМ более чем в 2 раза (относительно аналогичного индекса для 2D-контрольной группы ( $p < 0,05$ )), что предполагает уменьшение числа и/или площади клеток, контактирующих с электродом в этой группе исследования (рис. 1). Таким образом, наночастицы синтетического ГАП, без прямого контакта с ММСК жировой ткани человека, в присутствии в культуре гепарина в концентрации 1 МЕ/мл, влияют на подвижность исследуемых клеток.

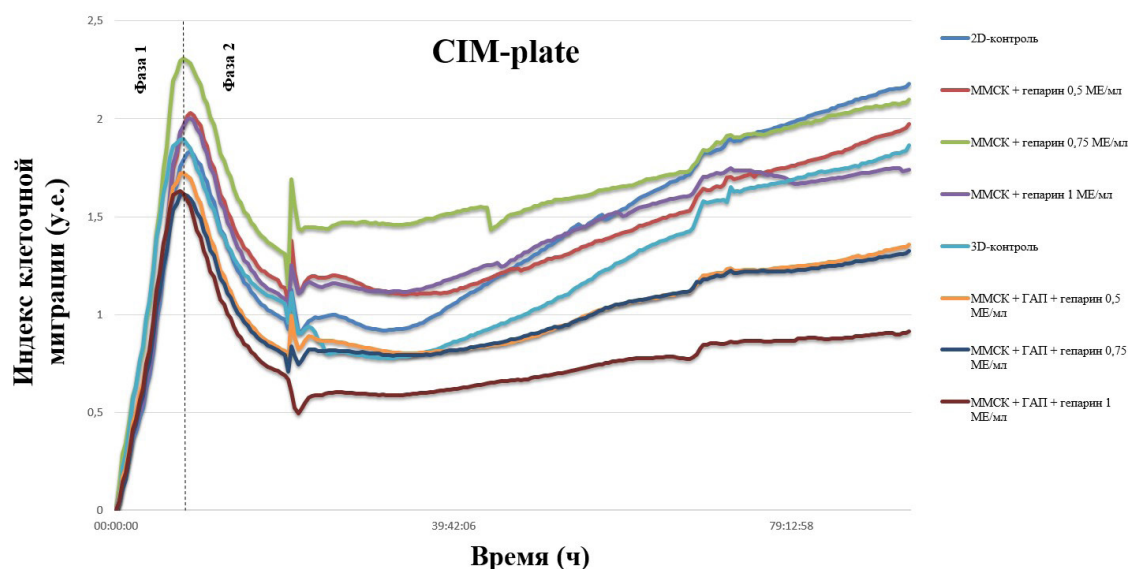


Рисунок 1. Кривые инвазии ММСК во всех группах исследования в электродной системе RTCA (92-ч мониторинг). Фаза 1 — фаза линейного роста; Фаза 2 — фаза логарифмического роста ИКМ.

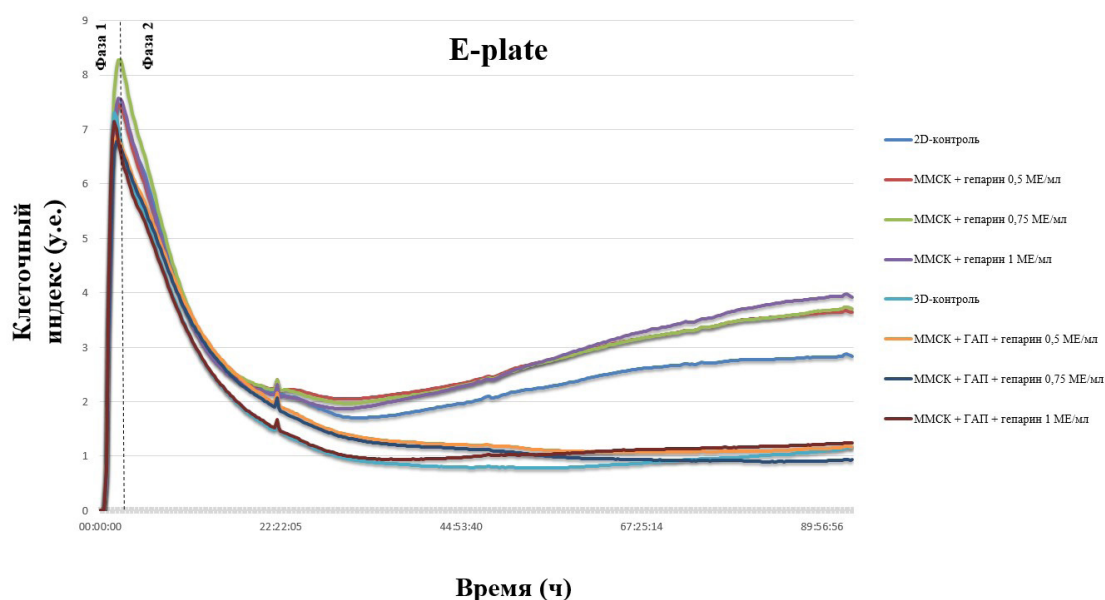


Рисунок 2. Кривые пролиферации ММСК во всех группах исследования в электродной системе RTCA (92-ч мониторинг). Фаза 1 — фаза линейного роста; Фаза 2 — фаза логарифмического роста КИ.

Приведенные на рисунке 2 данные демонстрируют максимальные показатели клеточного индекса во всех исследуемых культурах, преимущественно на 3й час от начала эксперимента, что свидетельствует об успешной адгезии клеток к электродной системе планшета E-plate. Далее, до момента добавления гепарина (22 часа), отмечается резкое снижение числа пролиферирующих клеток во всех экспериментальных группах, и клетки входят в фазу логарифмического роста.



По истечении 22 часов культивирования, в соответствии с дизайном исследования, в соответствующие лунки был добавлен гепарин в концентрациях (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл). Пролиферативная активность клеток в 3D-моделях, культивируемых с наночастицами синтетического ГАП в прямом контакте, через 25 часов от начала эксперимента, статистически значимо оказалась ниже значений, полученных при оценке 2D-моделей культивирования: 2D-контроль, 2D-модель культивирования с гепарином во всех исследуемых концентрациях (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл) ( $p < 0,05$ ). Таким образом, снижение пролиферативной активности в обозначенных группах, вероятно, обусловлено добавлением наночастиц ГАП.

По истечении 60 часов культивирования клеточный индекс в 2D-моделях в присутствии гепарина (0,5 и 1 МЕ/мл) оказался выше в сравнении со значениями, полученными при оценке 3D-контрольной группы и 3D-культур с гепарином во всех исследуемых концентрациях ( $p < 0,05$ ). В 2D-культуре в присутствии гепарина (0,75 МЕ/мл) показатель клеточного индекса статистически значимо повышался в сравнении с 3D-контролем и 3D-культурами с гепарином 0,75 МЕ/мл ( $p < 0,05$ ). Также стоит отметить, что в 2D-культурах в присутствии гепарина (во всех исследуемых концентрациях) наблюдалась тенденция к увеличению пролиферативного потенциала ММСК в сравнении с данными, полученными при оценке 2D-контроля.

На момент окончания эксперимента (по истечении 92 часов) нами были зарегистрированы стабильные уровни клеточного индекса в 3D-моделях, культивируемых с гепарином (рис. 2). На графике кривых пролиферации ММСК в 2D-контроле и 2D-культурах в присутствии гепарина во всех концентрациях клеточный индекс входит в фазу роста спустя 40 часов от начала эксперимента. Стабилизация уровня клеточного индекса наблюдалась с 60-и часов от начала запуска эксперимента. Так, пролиферативная активность 2D-культур с гепарином во всех исследуемых концентрациях отмечалась на более высоком уровне ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями, полученными при оценке 3D-контроля и 3D-культур в присутствии гепарина (0,5 и 0,75 МЕ/мл). Кроме того, клеточный индекс в 2D-модели с гепарином (1 МЕ/мл) был выше более чем в 3 раза в сравнении с 3D-моделью в присутствии гепарина в той же концентрации (1 МЕ/мл). Исходя из полученных данных, добавление нановзвеси ГАП в культуру ММСК жировой ткани человека оказывает негативное влияние на их пролиферативную способность.

## Обсуждение

Результаты, полученные с помощью электродной системы RTCA, позволили оценить влияние взвеси наночастиц ГАП и/или гепарина в диапазоне терапевтических концентраций (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл) на миграционную и пролиферативную способности культуры клеток ММСК жировой ткани человека *in vitro*.

В ходе проведенного эксперимента было выявлено, что наночастицы ГАП в присутствии гепарина во всех исследуемых концентрациях оказывают негативное влияние на миграционную способность ММСК, по сравнению с 2D-культурами ММСК с гепарином (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл), что было продемонстрировано снижением уровня ИКМ в исследуемых группах. Кроме того, было показано, что гепарин оказывает влияние на миграционную способность клеток в присутствии наночастиц ГАП, так как проходимость ММСК через поры планшета CIM-plate снижалась с увеличением дозы гепарина. Ранее нами было показано, что гепарин в концентрациях, превышающих терапевтические (1,3; 13; 130; 260 МЕ/мл), увеличивал миграционную способность ММСК при их сокультивировании *in vitro* в 2D- и 3D-культурах [9]. Однако в настоящем эксперименте нами продемонстрировано снижение потенциала ММСК к миграции в присутствии терапевтических доз гепарина (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл) и наночастиц ГАП в сравнении с 2D-контролем. Seeger F.H. и соавт. было показано, что гепарин блокирует передачу сигналов SDF1/CXCR4, связываясь с лигандом и рецептором, препятствуя тем самым миграции и хоумингу мононуклеарных клеток костного мозга [10]. Dan-li Fu и соавт. обнаружили, что поверхность с ГАП в эксперименте *in vitro* обладает способностью индуцировать экспрессию мРНК генов интегринов — молекул клеточной адгезии в ММСК [4]. Резюмируя вышесказанное, полученные нами результаты находят отражение в исследованиях других коллег и вносят понимание в нарушение процессов миграции за счет индуцированного влияния наночастиц ГАП на адгезивную способность ММСК.

Кроме того, полученные нами данные позволяют сделать вывод о снижении пролиферативной

способности ММСК в 3D-культурах в присутствии гепарина (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл). Однако, нами было выявлено индуцирующее влияние гепарина (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл) на клеточную пролиферацию в 2D-моделях культивирования, при этом клеточный индекс в этих группах повышался с увеличением дозы гепарина и спустя 92 часа от начала эксперимента был выше, чем клеточный индекс в 2D-контрольной группе. Эти результаты согласуются с данными, предполагающими, что гепарин может влиять на пролиферацию и функциональную активность ММСК [8].

В работе Jianzhong Hu была продемонстрирована активация процессов пролиферации, адгезии и увеличение жизнеспособности ММСК, культивируемых на каркасах для регенерации костных дефектов с ГАП-покрытием при сравнении с каркасами без них [6]. Согласно полученным нами результатам, комбинированное влияние гепарина и ГАП негативно отражается на пролиферативной способности ММСК, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования для изучения клеточно-молекулярных механизмов их взаимодействия.

### Заключение

Таким образом, спустя 92 часа экспериментального культивирования, наблюдалось ингибирующее действие гепарина в исследованных концентрациях (0,5; 0,75; 1 МЕ/мл) на миграционную активность ММСК как в присутствии, так и в отсутствии нановзвеси ГАП.

Гепарин во всех исследуемых концентрациях (0,5; 0,75; 1 МЕ/мл) оказывал индуцирующее влияние на пролиферативную активность ММСК без нановзвеси ГАП. Напротив, при сокультивировании ММСК с гепарином во всех концентрациях (0,5; 0,75; 1 МЕ/мл) и взвесью наночастиц ГАП значение показателя КИ снижалось.

Наши данные могут представлять большой интерес для дальнейшего изучения возможных терапевтических применений в области регенеративной медицины.

*Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку Программы стратегического академического лидерства ПРИОРИТЕТ 2030 в СибГМУ.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Chen Q., Sivakumar P., Barley C., Peters D.M., Gomes R.R., Farach-Carson M.C. et al. Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1. *J Biol Chem.* 2007;282: 26418–30.
2. Cuker A., Arepally G.M., Chong B.H., Cines D.B., Greinacher A., Gruel Y. et al. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2018; 2: 3360–92.
3. Edeer A.D., Comez S., Damar H.T., savci A. Prevalence and risk factors of venous thromboembolism in postoperative patients: A retrospective study. *Pak J Med Sci.* 2018; 34: 1539–44.
4. Fu D., Jiang Q., He F., Fu B. et al. Adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells on porous titanium surfaces with strontium-doped hydroxyapatite coating. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2017; 18: 778–88.
5. Gorbet M.B., Sefton M.V. et al. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials.* 2004; 25: 5681–703.
6. Hu J., Zhou Y., Huang L., Liu J., Lu H. et al. Effect of nano-hydroxyapatite coating on the osteoinductivity of porous biphasic calcium phosphate ceramics. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014; 15: 114.
7. Labarrere C.A., Dabiri A.E., Kassab G.S. et al. Thrombogenic and Inflammatory Reactions to Biomaterials in Medical Devices. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8.
8. Laner-Plamberger S., Lener T., Schmid D., Streif D.A., Salzer T., Öller M. et al. Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate. *J Transl Med.* 2015; 13: 354.
9. Норкин И.К., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Мелашенко Е.С., Мелашенко В.В., Шунькин Е.О. я доктор Стимулирующее влияние высоких доз гепарина на миграционную активность и сохранение стволовости МСК в присутствии остеозамещающих материалов. *Медицинская иммунология.* 2021; 23: 831–8.
10. Seeger F.H., Rasper T., Fischer A., Muhly-Reinholz M., Hergenreider E., Leistner D.M. et al. Heparin disrupts the CXCR4/SDF-1 axis and impairs the functional capacity of bone marrow-derived

mononuclear cells used for cardiovascular repair. *Circ Res.* 2012; 111: 854–62.

11. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. я доктор Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. *Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия.* 2012 г.; 7.

#### Авторы

Норкин Игорь Константинович

Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта

Аспирант, техник

Российская Федерация, 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, д. 6

norkin\_igor@mail.ru

Юрова Кристина Алексеевна

Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта

Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник

Российская Федерация, 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, д. 6

kristina\_kofanova@mail.ru

Хазиахматова Ольга Геннадьевна

Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Российская Федерация, 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, д. 6

hazik36@mail.ru

Малашченко Владимир Владимирович

Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта

Кандидат биологических наук, научный сотрудник

Российская Федерация, 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, д. 6

vmalashchenko@kantiana.ru

Лигатюк Денис Дмитриевич

Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта

Инженер

Российская Федерация, 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, д. 6

Хлусов Игорь Альбертович

Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)

Доктор медицинских наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии

Российская Федерация, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

khlusov63@mail.ru

Литвинова Лариса Сергеевна

Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта

Доктор медицинских наук, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий

Российская Федерация, 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, д. 6

larisalitvinova@yandex.ru

**I.K. Norkin<sup>1</sup>, K.A. Yurova<sup>1</sup>, O.G. Khaziahmatova<sup>1</sup>, V.V. Malashchenko<sup>1</sup>,  
D.D. Ligatyuk<sup>1</sup>, I.A. Khlusov<sup>2</sup>, L.S. Litvinova<sup>1</sup>**

## **EFFECTS OF THERAPEUTIC DOSES OF HEPARIN ON MSC FUNCTIONAL ACTIVITY IN MODELING THE MECHANISMS OF OSTEOINTEGRATION UNDER *IN VITRO* CULTIVATION**

<sup>1</sup> Center of Immunology and Cellular Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation;

<sup>2</sup> Siberian State Medical University (SSMU), Tomsk, Russian Federation

**Abstract.** The use of artificial materials in regenerative medicine is accompanied by the development of an inflammatory response and the initiation of blood clotting due to the contact of the implant with the soft tissues of the body. All this leads to the formation of thrombosis of the major and main arteries and the development of serious complications. To prevent the development of postoperative pathological conditions caused by hypercoagulable syndrome, classical therapeutic strategies with anticoagulants (mainly heparin) are used. However, the described treatment tactics lead to an interruption of the migration and adhesion processes of mesenchymal stem cells (MSC), which negatively affects the callus formation and the processes of osseointegration of the implant. **The aim** of this study was to investigate the effect of a suspension of HA nanoparticles in the presence of heparin in a gradient of therapeutic concentrations on migratory and proliferative activity of MSCs in human adipose tissue under *in vitro* cultivation conditions. **Methods.** To evaluate the migration and proliferation potential of MSC in the presence of HA nanosuspension and/or heparin, an electrode system for continuous observation — xCELLigence® RTCA DP was used. **Results.** A significant decrease in the migratory activity and proliferative potential of MSC was observed under the conditions of their co-cultivation with HA nanosuspension in the presence/absence of heparin (0.5–1 IU/ml). **Conclusion.** The results of the study may serve as a prerequisite for the development of new therapeutic approaches for the use of heparin in surgical patients at high risk of postoperative thrombosis after osteosynthesis.

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

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Igor K. Norkin

norkin\_igor@mail.ru

Received 26.07.2022

For citation:

Norkin I.K., Yurova K.A., Khaziahmatova O.G., Malashchenko V.V., Ligatyuk D.D., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Effects of therapeutic doses of heparin on MSC functional activity in modeling the mechanisms of osteointegration under *in vitro* cultivation. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 231–240. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-231-240 (In Russ)

### REFERENCES

1. Chen Q., Sivakumar P., Barley C., Peters D.M., Gomes R.R., Farach-Carson M.C. et al. Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1. J Biol Chem. 2007;2 82: 26418–30.
2. Cuker A., Arepally G.M., Chong B.H., Cines D.B., Greinacher A., Gruel Y. et al. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia. Blood Adv. 2018; 2: 3360–92.
3. Edeer A.D., Comez S., Damar H.T., savci A. Prevalence and risk factors of venous thromboembolism



in postoperative patients: A retrospective study. *Pak J Med Sci.* 2018; 34: 1539–44.

4. Fu D., Jiang Q., He F., Fu B. et al. Adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells on porous titanium surfaces with strontium-doped hydroxyapatite coating. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2017; 18: 778–88.

5. Gorbet M.B., Sefton M.V. et al. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials.* 2004; 25: 5681–703.

6. Hu J., Zhou Y., Huang L., Liu J., Lu H. et al. Effect of nano-hydroxyapatite coating on the osteoinductivity of porous biphasic calcium phosphate ceramics. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014; 15: 114.

7. Labarrere C.A., Dabiri A.E., Kassab G.S. et al. Thrombogenic and Inflammatory Reactions to Biomaterials in Medical Devices. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8.

8. Laner-Plamberger S., Lener T., Schmid D., Streif D.A., Salzer T., Öller M. et al. Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate. *J Transl Med.* 2015; 13: 354.

9. Norkin I.K., Yurova K.A., Khaziahmatova O.G., Melashchenko E.S., Malashchenko V.V., Shun'kin E.O. i dr. Stimuliruyushchee vliyaniye vysokih doz geparina na migratsionnyuyu aktivnost' i sohraneniye stvolovosti MSK v prisutstvii osteozameshchayushchih materialov. *Medicinskaya Immunologiya.* 2021; 23: 831–8 (in Russ).

10. Seeger F.H., Rasper T., Fischer A., Muhly-Reinholz M., Hergenreider E., Leistner D.M. et al. Heparin disrupts the CXCR4/SDF-1 axis and impairs the functional capacity of bone marrow-derived mononuclear cells used for cardiovascular repair. *Circ Res.* 2012; 111: 854–62.

11. Shahpazyan N.K., Astrelina T.A., Yakovleva M.V. i dr. Mezenhimal'nye stvolovye kletki iz razlichnyh tkanej cheloveka: biologicheskie svoystva, ocenka kachestva i bezopasnosti dlya klinicheskogo primeneniya. *Kletochnaya Transplantologiya I Tkanevaya Inzheneriya.* 2012; 7.(in Russ)

#### Authors

Igor K. Norkin

Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, IKBFU

PhD student, technician

6 st. Gaidar Kaliningra Russian Federation 236001

norkin\_igor@mail.ru

Kristina A. Yurova

Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, IKBFU

PhD of Medical Sciences, Senior Researcher

6 st. Gaidar Kaliningra Russian Federation 236001

kristina\_kofanova@mail.ru

Olga G. Khaziakhmatova

Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, IKBFU

PhD of Biological Sciences, Senior Researcher

6 st. Gaidar Kaliningra Russian Federation 236001

hazik36@mail.ru

Vladimir V. Malashchenko

Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, IKBFU

PhD of Biological Sciences, Researcher

6 st. Gaidar Kaliningra Russian Federation 236001

vmalashchenko@kantiana.ru

Denis D. Ligatyuk

Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, IKBFU

Laboratory engineer

6 st. Gaidar Kaliningra Russian Federation 236001

Igor A. Khlusov  
M.D., Professor of the Department of Morphology and General Pathology  
Siberian State Medical University (SSMU)  
2 Moskovsky Trakt Tomsk Russian Federation 634050  
khlusov63@mail.ru

Larisa S. Litvinova  
Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, IKBFU  
M.D., Director of the Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, IKBFU  
6 st. Gaidar Kaliningra Russian Federation 236001  
larisalitvinova@yandex.ru