

Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства

Р.В. Деев¹, Н.В. Цупкина², И.Я. Бозо³, М.С. Калигин⁴, А.Р. Гребнев³, А.А. Исаев¹, Г.П. Пинаев²

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

⁴ Казанский государственный медицинский университет, Казань

The Tissue Engineering Bone: a Methodological Basis and Biological Properties

R.V. Deev¹, N.V. Tsupkina², I.J. Bozo³, M.S. Kaligin⁴, A.R. Grebnev³, A.A. Isaev¹, G.P. Pinaev²

¹ Human Stem Cells Institute, Moscow

² Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg

³ Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg

⁴ Kazansky State Medical University, Kazan

На основании собственных экспериментальных данных показано, что критическим этапом создания тканеинженерного эквивалента кости является расчет необходимого количества остеогенных клеток и обеспечение их надежной адгезии к поверхности материала-носителя. Эксперименты *in vivo* с использованием различных меток (PKH-26, GFP) показали, что пересаженные на носителя клетки сохраняют свою жизнеспособность в костной ране. Они участвуют в репаративной регенерации путем дивергентной дифференцировки в ортодоксальных для ММСК направлениях и, вероятно, синтезом компонентов матрикса.

Ключевые слова: тканеинженерный эквивалент кости, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, деминерализованный костный матрикс.

В областях хирургии, связанных с лечением пациентов при патологии костной ткани (травматология и ортопедия, челюстно-лицевая хирургия, нейрохирургия и др.), неизбежно возникает необходимость восполнения костных дефектов как малого, так и большого размеров. В ряде случаев, применяющиеся в клинической практике стандартные методы костной пластики неспособны оптимально восстановить целостность поврежденных костей, в связи с топографо-анатомическими особенностями того или иного костного органа и (или) приобретенным явлением «остеогенной недостаточности» [1], что определяет необходимость разработки и использования новых костнопластических методов. Наиболее молодым, перспективным, но пока еще недостаточно изученным направлением получения костнопластических материалов, является биотехнологическое, позволяющее отказаться от дополнительных травмирующих воздействий, связанных с получением аутогенного костного материала, заменив его созданным *in vitro* тканеинженерным эквивалентом кости (ТИЭК), приближенным по своим биологическим и (или) в ряде модификаций и механическим свойствам к нативной ткани.

ТИЭК (костный графт) — это конструкция, состоящая из двух взаимодействующих компонентов — малодифференцированных клеток, способных или

Based on our experimental data show that a critical step in creating tissue engineering bone is the calculation of the required number of osteogenic cells and providing them with reliable adhesion to the surface of the carrier material. Experiments *in vivo* using different labels (PKH-26, GFP) showed that the transplanted cells on the carrier retain their viability in the bony injury. They participate in the reparative regeneration by divergent differentiation in the orthodox way for ITC, and probably the synthesis of matrix components.

Key words: tissue engineering bone, multipotent mesenchymal stromal cells, demineralized bone matrix.

коммитированных к дифференцировке в остеогенном направлении, и матрикса-носителя (скаффолда). Основными критическими моментами создания ТИЭК, пригодного для использования в клинической практике, являются выбор адекватного носителя, методов оптимизации адгезии культуры клеток к его поверхности, способов поддержания их функционально активного состояния, а также подтверждение безопасности и эффективности его участия в репаративном остеогенезе *in vivo*.

К настоящему времени накоплен большой объем экспериментальных данных, касающихся разработки и апробации различных материалов-носителей в рамках создания ТИЭК. Большая часть из них подбиралась исследователями с учетом общепринятых параметров, которым должен соответствовать «идеальный носитель» равно как и любой костнопластический материал: остеогенность (наличие клеточных источников для процесса репаративной регенерации), остеоиндуктивность (способность активировать остеогенные элементы реципиентного ложа), остеопротективность (способность частично выполнять механические функции кости на время имплантации), остеокондуктивность (свойство быть проводником для роста воссоздаваемой костной ткани) [2]. Важно отметить, что в качестве матриксов для ТИЭК рассматриваются материалы, подверженные

e-mail: romdey@gmail.com

последовательной, безопасной для организма и пролонгированной биодеградации [3], так как наличие в составе регенерата не костных включений неприемлемо с позиции полноценности репаративного остеогенеза и восстановления биомеханических свойств кости. В этой связи, применение металлических, ряда керамических и иных нерезорбируемых конструкций в большинстве случаев сложно признать перспективным.

Понимание адгезии клеточной культуры к поверхности носителя как критического этапа в создании ТИЭК, во многом определяющего эффективность его дальнейшего использования *in vivo*, позволило поновому отнестись к разработке и выбору оптимального матрикса, определив более пристальное внимание к материалам, сходным по химическому составу и структуре костной ткани, а также к комплексным носителям [4] и методам обработки, оптимизирующим адгезию.

Как правило, для совмещения культуры остеогенных клеток с материалом-носителем выполняют процедуру длительного пропитывания клеточной взвесью носителя с последующим культивированием в условиях культуральной среды и CO_2 -инкубатора (от нескольких часов [4] до нескольких суток [5]). Контроль полученного результата ограничивается, зачастую, детекцией незначительного количества адгезировавшихся к поверхности клеток при помощи световой микроскопии [5, 6], что, по нашему мнению, не позволяет объективно оценивать полученный «биологический препарат» и существенно ухудшает возможности прогнозирования его биологического действия *in vivo*.

Учитывая проблемы в оптимальном совмещении культур стромальных клеток и носителей, нами было предпринято исследование, нацеленное на разработку оптимального метода совмещения стромальных клеток с носителем из деминерализованного костного матрикса (ДКМ). Дополнительной задачей являлась оценка выживаемости и морфофункционального состояния клеток в эксперименте *in vivo*.

Материал и методы

Исследование выполнено на кроликах массой 2,5–3 кг с соблюдением правил гуманного обращения с животными. Для создания ТИЭК применяли ДКМ, предоставленный тканевым банком ФГУ РосНИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена. В качестве исходной клеточной популяции для создания ТИЭК использовали мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), выделяемые из красного костного мозга кроликов.

Получение ММСК

Красный костный мозг кроликов эксплантировали путем пункции крыльев подвздошных костей в области задней верхней ости. ММСК получали согласно протоколу, который в качестве селективного критерия ММСК предполагает их способность к адгезии к поверхности культурального пластика: кроветворную строму, выделенную из пунктата подвергали центрифугированию, трипсинизации и фильтрации. Культуру стромальных клеток 3–4 пассажей содержали в остеогенной среде (индукторы – L-глицерофосфат натрия, L-аскорбат, дексаметазон). Подсчет числа клеток выполняли в камере Горяева. Остеогенную дифференцировку ММСК подтверждали цитохими-

ческими реакциями на щелочную фосфатазу (ЩФ), пользуясь стандартной смесью реактивов BCIP-NBT (Sigma, США), и соли кальция по методу ван Коса или ализарином красным. С целью прослеживания клеток после графтинга ТИЭК клетки в некоторых случаях перед совмещением с ДКМ метили «короткоживущим» (до 20 сут.) флюорохромом PKH-26 (согласно протоколу фирмы-производителя; Sigma, США). Часть культур трансфицировали лентивирусным вектором с GFP по стандартному протоколу (любезно предоставлен профессором Boris Fehse).

Совмещение ДКМ и клеточной культуры

Основным отличительным моментом нашего исследования являлось то, что перед совмещением клетки помещали в гелевый носитель из природного коллагена с сохраненными телопептидами, а затем, до полимеризации геля, полученной композицией пропитывали носитель из ДКМ из расчета 10 млн клеток на 1 cm^3 пористого носителя. Способ совмещения лег в основу патента [7]. Оптимальное число клеток для заселения 1 cm^3 ДКМ рассчитано при помощи ранее предложенной модели и соответствующей ей формулы [8]. Для удобства расчетов 1 cm^3 ДКМ был принят за куб, перфорированный прямыми каналами одинакового диаметра, проходящими в трех взаимоперпендикулярных плоскостях и пересекающимися так, что каждый имеет одинаковое число равноудаленных соустий с соседними каналами. Для этой модели вычисляли общую площадь поверхности, доступную для адгезии клеток. Согласно данным световой и электронной сканирующей микроскопии губчатого вещества костей средний диаметр макропор равен 0,05 см, а толщина трабекул – 1/4 диаметра макропор, т.е. 0,125 см. Исходя из этого, площадь минимального условного квадрата с четырьмя отверстиями каналов находили путём сложения двух диаметров (\varnothing) с длинами двух межпоровых промежутков и возведения результата в квадрат:

$$S = (2\varnothing + 2 \times 1/4\varnothing)^2 = (2 \times 0,05 + 2 \times 0,125)^2 = 0,0156 \text{ см}^2.$$

На данной площади имеется 4 отверстия, следовательно, на 1 cm^2 – 256, расположенных 16×16 , а всего в кубе – 768 сквозных каналов. Каждый имеет 16 перфораций, образованных прободением двумя противоположными каналами. Таким образом, «полезная» длина поверхности, доступной для адгезии клеток, составляет:

$$h = 1 \text{ см} - 16 \times 0,05 \text{ см} = 0,2 \text{ см}.$$

Общая площадь боковой поверхности каналов носителя определяется по формуле:

$$S = 2\pi rh = 0,05 \text{ см} \times 3,14 \times 0,2 \text{ см} \times 768 = 24,1 \text{ см}^2.$$

Площадь поверхности губчатого матрикса равна сумме площадей каналов и площади поверхности куба за вычетом площадей отверстий:

$$S' = 6 \text{ см}^2 - \pi r^2 \times 768 = 4,5 \text{ см}^2, \text{ т.е. } 28,6 \text{ см}^2.$$

Так как площадь контакта каждой клетки в условиях *in vitro* с подложкой равна 300 μm^2 ($3 \times 10^{-6} \text{ см}^2$), то площадь поверхности губчатого ДКМ достаточна для размещения 9,5 млн клеток ($N = S'/3 \times 10^{-6}$).

Эффективность совмещения культуры клеток и ДКМ оценивалась с помощью световой микроскопии, анализа полутонких срезов с окраской толудиновым

синим, а также посредством трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии (ЭМ).

Эксперимент *in vivo*

Для оценки выживаемости клеток в условиях *in vivo*, возможности участия в репаративном остеогенезе и механизмах вовлечения в регенераторный процесс, трансплантировали полученные ТИЭК в область протяженного дефекта костей голени кроликов. Выполняли интрамедуллярную фиксацию костных опилов с постановкой П-образного дистрактора, фиксирующего диастаз в 2 см. Через 18 сут. из области регенерата животных забирали биоптат для проведения флюоресцентного анализа с применением метки 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), который избирательно связывается с ДНК всех клеток. Через 30 сут. выводили кроликов из эксперимента, выполняли гистологический анализ препаратов регенерата.

При помощи моноклональных антител (AbCam, Великобритания) выявляли GFP в срезах костнохрящевых регенератов. Реакции ставили методом EnVision™/HRP (DakoCytomation, Дания). Для демаскировки антигенов депарафинированные срезы подвергали высокотемпературной обработке на водяной бане в цитратном буфере (pH = 6,0) (98°C, 25 мин). Далее срезы инкубировали с первичными антителами. Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции использовали диаминобен-

зидин DAB-kit (DakoCytomation, Дания). Результат положительной реакции: темно-коричневое окрашивание соответствующих структур.

Результаты и обсуждение

В течение 3–4 пассажей было получено порядка 10 млн клеток, цитохимические методы позволили удостовериться в реализации ими в условиях *in vitro* остеогенных дифференцировочных потенциалов [9].

При совмещении клеток полученной культуры на ДКМ распространенным методом пропитывания и последующего инкубирования формируемого ТИЭК без применения дополнительных способов оптимизации адгезии, эффективность совмещения была чрезвычайно низкой. Так, при изучении полутонких срезов отчетливо определялись клетки кубовидной формы с крупными ядрами и выраженными ядрышками (рис. 1А); достаточно плотно прилежащие к поверхности носителя, что, казалось, дает основания рассчитывать на адекватную адгезию к материалу-носителю. Однако по данным сканирующей ЭМ клетки на поверхности материала были гетероморфны (рис. 1Б), большая часть из них шаровидной формы, что косвенно свидетельствовало о недостаточной адгезии. На ультратонких срезах между клеткой и носителем практически всегда обнаруживали щель, в которую выстояли деформированные и частично разрушенные при обработке ДКМ коллагеновые волокна (рис. 1В).

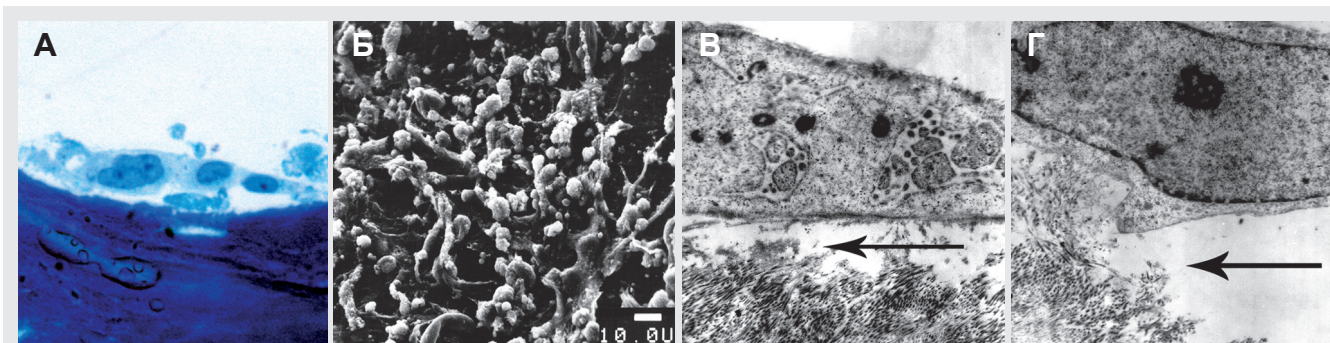


Рис. 1. Культивированные ММСК на поверхности деминерализованного костного матрикса: А – полутонкий срез; Б – сканирующая электронная микрофотография; В, Г – трансмиссионные электронные микрофотографии, стрелками указано пространство между ДКТ и плохо адгезированными клетками. Окраска: А – толуидиновый синий. Ув.: А $\times 1000$; В, Г $\times 3000$

С учетом неудовлетворительных результатов совмещения был разработан метод, предполагающий иммобилизацию остеогенных клеток коллагеновым (или фибриновым) гелем, служащим своего рода связующим звеном между культурой и носителем, что привело к значимому улучшению адгезионных свойств. После такого способа совмещения клетки полностью покрывали материал-носитель (рис. 2). На ультратонких срезах регистрировалось плотное прилегание клеток к поверхности ДКТ. Клетки демонстрировали признаки активных биосинтетических процессов – в них выявлены ядро богатое эухроматином, развитый белоксинтезирующий аппарат, а также вскрытые вакуоли с секретуемыми субъединицами волокнистых белков (см. рис. 2). Данные признаки в совокупности позволяют констатировать, что использованные нами образцы ДКМ биосовместимы, а выполненная модификация его поверхности и клеточной адгезии оказалась эффективной.

Оптимальная адгезия стромальных клеток к поверхности носителя – важнейшее условие реализации биологического действия ТИЭК. На поверхности ММСК экспрессируется огромное количество молекул адгезии различных классов, которые служат первыми звеньями в цепи рецепции и трансдукции механических сигналов, вовлеченных в регуляцию основных процессов функционирования клеток [10]. В этой связи, адекватное совмещение клеток и матрикса должно рассматриваться как ключевой, критический момент в создании ТИЭК. Однако высокие требования, предъявляемые к материалам, проходящим доклиническую апробацию, определяют необходимость использования агрессивных методов их обработки. Зачастую, материал, в частности, ДКМ, теоретически оптимальный для размещения клеток и поддержания их в функционально активном состоянии, в процессе обработки теряет ряд своих положительных свойств [11], в том числе адгезионные.

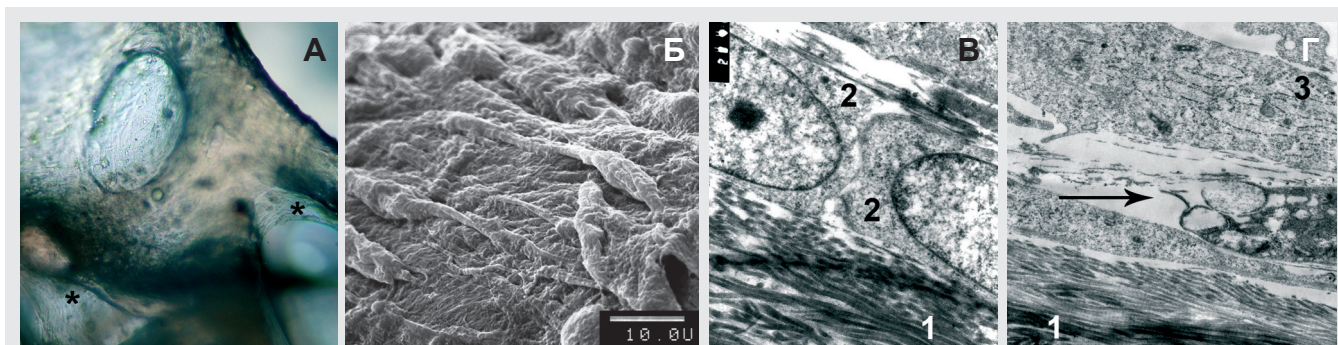


Рис. 2. Культивированные ММСК на поверхности деминерализованного костного матрикса после оптимизации адгезии: А – внешний вид ТИЭКТ, * – большое количество ММСК; Б – сканирующая электронная микрофотография; В, Г – трансмиссионные электронные микрофотографии, стрелкой указаны субъединицы волоконистых белков; 1 – ДКМ; 2 – остеогенные клетки на поверхности ДКМ; 3 – развитая гЭПС в одной из клеток на поверхности ДКМ. Ув.: А ×10; В, Г ×3000

Известно, что основными органическими компонентами костного матрикса, вовлеченными в образование фокальных контактов стромальных клеток, являются коллаген, фибронектин, остеопонтин, остеонектин, тромбоспондин, костный сиалопротеин, аминокислотные последовательности которых содержат специфический домен – RGD (ARG-GLY-ASP). RGD является лигандом для рецепторов семейства интегринов, экспрессирующихся в том числе и стромальными клетками, необходимым для реализации механизмов адгезии [12], поэтому выделенный трипептид (ARG-GLY-ASP) используется некоторыми исследователями в очищенном виде в качестве дополнительного компонента носителя тканеинженерного эквивалента [13]. Вполне вероятно, что полученные нами на первом этапе неудовлетворительные результаты совмещения клеток и ДКМ без иммобилизации клеток в коллагеновом геле связаны с нарушением структуры белков межклеточного матрикса, в частности, их RGD последовательностей стерилизующими и деминерализующими агентами (кислотами с возможным включением этанола, метанола, эфира, хлороформа) и стерилизационными мероприятиями. Нивелирование неблагоприятного воздействия технологической обработки ДКМ за счет применения коллагенового геля с сохраненными сайтами связывания – лигандами четырех интегриновых рецепторов ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$, $\alpha11\beta1$) – привело к адекватному совмещению компонентов ТИЭК. Перспективной является также возможность использования вместо коллагенового – фибринового геля.

Основная задача носителя – обеспечение выживаемости клеток после трансплантации *in vivo*, а

также поддержание их функционально активного состояния и остеогенных потенциалов, что не может быть достигнуто при введении в область дефекта взвеси клеток [14], неспособных прикрепиться к пораженному патологическим процессом реципиентному ложу, тем более при постоянной экссудации и сниженной pH среды. Таким образом, вовлечение субклеточных структур, обеспечивающих адгезию клеток к матриксу еще на претрансплантационном этапе, опосредует устойчивость и адаптацию культуры к условиям *in vivo*, создавая необходимый плацдарм для проявления процессов пролиферации, дифференцировки и продукции биологически активных веществ. В этой связи, выживаемость клеток в условиях *in vivo* в определенной степени свидетельствует об адекватности совмещения их с носителем.

Исследование судьбы пересаженных остеогенных клеток в составе ТИЭК, проведенное на ранних сроках (18–20 сут.) с помощью флуоресцентной микроскопии биоптатов регенерата показало, что пересаженные клетки сохранили в костной ране свою жизнеспособность – меченные РКН-26 клетки – дериваты клеточного компонента ТИЭК обнаруживались в тканевых структурах костной мозоли (рис. 3). Однако, следует указать, что в изученных препаратах они преимущественно были локализованы в межтрабекулярных пространствах, в то время, как остециты новообразованных костных трабекул, меченные DAPI, не несли метки РКН-26, что позволяет судить о развитии их преимущественно из камбия реципиентного ложа, а не из клеточного компонента ТИЭК, что, тем не менее, не исключает регуляторно-трофическую функцию пересаживаемых клеток (см. рис. 3).

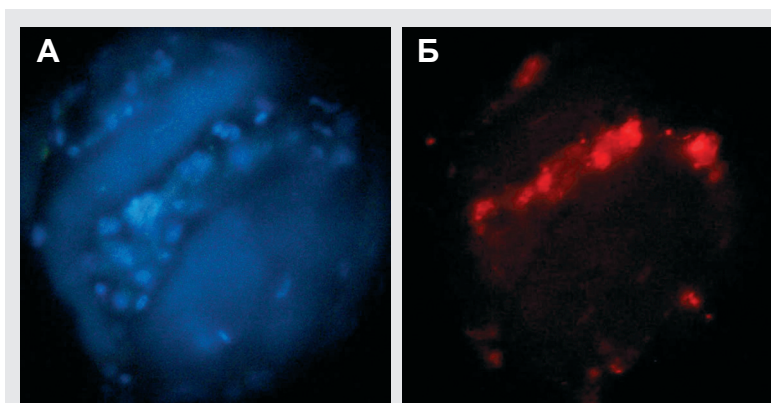


Рис. 3. Участок костного регенерата с ТИЭК, 18 сут.: А – флуоресценция DAPI в ядрах остеоцитов костных трабекул и клеток в межтрабекулярном пространстве [*]; Б – флуоресценция меченых РКН-26 трансплантированных клеток (то же поле зрения). Ув. ×100

Для уточнения судьбы и роли остеогенных клеток ТИЭК был проведен поиск GFP-положительных клеток в составе регенерата через 30 сут. после графтинга. На этих сроках костно-хрящевой регенерат состоял из различных тканей: новообразованной ретикулофиброзной костной ткани, гиалиновой хрящевой ткани, волокнистой соединительной; в просвете костномозгового канала — желтый костный мозг с очагами кроветворения. Компактная пластинка окружающих дефект костных опилов спонгизирована. Материал носителя был практически полностью резорбирован, заменен новообразованной костной тканью, трабекулы которой непосредственно продолжали балки ДКМ.

Хрящевая ткань располагалась преимущественно в центральных отделах дефекта, в то время как костная часть регенерата была непосредственно связана с источниками периостального и интермедиарного источника остеогистогенеза. Подобное распределение тканей в мультитканевом костном регенерате соответствует зонам преимущественного кровоснабжения.

При анализе препаратов после иммуногистохимического выявления зеленого флуоресцентного белка, выявлено, что часть клеток как в костной, соединительнотканной, так и в хрящевой частях регенерата несли данную метку (рис. 4). Значительная часть GFP⁺ клеток локализовалась в составе периваскулярного окружения. Данное явление может быть объяснено двояко. С одной стороны,

сосуды, врастающие в соединительнотканную и хрящевую части регенерата из интермедиарной зоны могут увлекать с собой клетки, привнесенные в составе графта, последние в этом случае не только сопровождают рост кровеносных сосудов, но и синтезируют необходимые для этого цитокины. С другой стороны, в ходе репаративного процесса пересаженные клетки могут стремиться к более оксигенированным регионам регенерата — в периваскулярные области.

Меченые клетки в хрящевых частях регенерата располагались без видимых закономерностей, диффузно распределяясь по тем или иным участкам. Обращает на себя внимание, что, как правило, они находились не одиночно, а небольшими группами, разделенными прослойками хрящевого матрикса, что косвенно свидетельствует о протекании с пересаженными клетками ряда фундаментальных процессов. Во-первых, их выживание в костной ране, чему могло способствовать предварительное адгезированное к носителю состояние, что препятствует немедленной элиминации из области регенерации раневым трансудатом. Во-вторых, групповое расположение позволяет предполагать их пролиферацию, т.е. непосредственный вклад в формирование клеточной массы регенерата. В-третьих, наличие между мечеными клетками матрикса говорит и о продуктивном участии в регенерации, т.е. синтезе специфических для скелетных тканей компонентов.

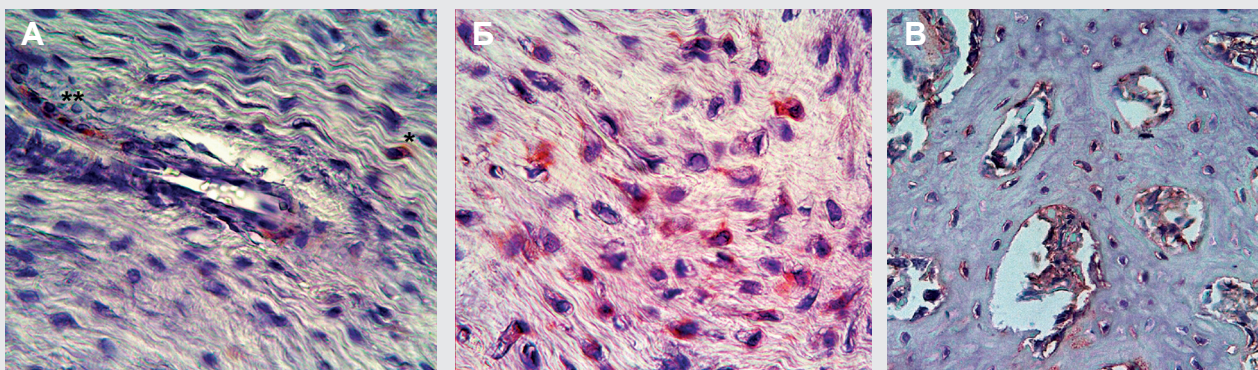


Рис. 4. Участок костного регенерата с ТИЭК, 30 сут.: А — соединительнотканная часть регенерата с GFP-положительными фиброцитами (*) и периваскулярными клетками (**); Б — хрящевая часть регенерата с GFP-положительными хондроцитами; В — костная часть регенерата с единичными GFP-положительными остеобластами. Продукт реакции докрашен диаминобензидином; коричневого цвета. Ув.: А, Б ×200; В ×100

Наличие большого количества немеченых клеток позволяет исключить артефакты при проведении иммуногистохимического исследования.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили установить принципиально важный факт — непосредственное участие пересаженных клеток со скелетогенным потенциалом в репаративном процессе, в том числе путем дивергентной дифференцировки по ортодоксальным для ММСК направлениям, что было показано нами и ранее на другой экспериментальной модели [15]. Позднее эти данные были

подтверждены при трансплантации костного мозга животным с моделью несовершенного остеогенеза [16–18].

Выявленные обстоятельства дополняют представления об участии пересаженных ММСК в восстановительных процессах, в частности — в репаративном остеогенезе, поскольку демонстрируют его непосредственно в раневом процессе *in vivo*, а не только в искусственных культуральных условиях или в относительно изолированных условиях внутрибрюшинно имплантированных диффузионных камер.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Деев Р.В., Исаев А.А., Кочиш А.Ю. и др. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2007; 2(4): 18–30.
2. Лысенко Л.Н. Путь от открытия до теоретических концепций Колумба биокерамики — профессора Лари Хенча. Проблемы современного биоматериаловедения. Клиническая имплантология и стоматология 1997; 2: 59–63.
3. Лысенко Л.Н. Клеточные аспекты замещения дефектов костной ткани стеклокристаллическими материалами. Клиническая имплантология и стоматология 2001; 3-4: 109–111.
4. Zhao Z., Yang D., Ma X. et al. Successful repair of a critical-sized bone defect in the rat femur with a newly developed external fixator. *Tohoku J. Exp. Med.* 2009; 219: 115–20.
5. Щепкина Е.А., Кругляков П.В., Соломин Л.Н. и др. Трансплантация аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на деминерализованном костном матриксе при лечении ложных суставов длинных трубчатых костей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2007; 2(3): 67–74.
6. Сергеева Н.С., Франк Г.А., Свиридова И.К., Кирсанова В.А. и др. Роль аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в тканеинженерных конструкциях на основе натуральных кораллов и синтетических биоматериалов при замещении костных дефектов у животных. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2009; 4(4): 56–64.
7. Деев Р.В., Тихилов Р.М., Цупкина Н.В. и др. Патент: Способ совмещения культивированных остеогенных клеток и трехмерного материала-носителя. 2008150694/15(066622), 22.12.2008.
8. Бозо И.Я. Расчет количества клеток для создания тканеинженерного эквивалента губчатой кости. Итоговая военно-научная конференция курсантов и слушателей академии. Тезисы докладов 2006; СПб: 19–20.
9. Деев Р.В., Николаенко Н.С., Цупкина Н.В. и др. Формирование и морфофункциональная характеристика остеобластического фенотипа в клеточных культурах *in vitro*. Цитология 2004; 46(3): 185–90.
10. Alpin A.E., Howe A., Alahari S.K. et al. Signal transductions and signal modulations by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin cell adhesion molecule and selectins. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50(2): 197–263.
11. Zhang M., Powers R.M., Wolfenbarger L. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Periodontol.* 1997; 68 (11): 1085–92.
12. Ruoslahti E., Pierschbacher M. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238: 491–7.
13. Duggal S., Frønsdal K.B., Szöke K. et al. Phenotype and gene expression of human mesenchymal stem cells in alginate scaffolds. *Tissue Eng.* 2009; 15(7): 1763–73.
14. Kuznetsov S.A., Robey P.G. A look at the history of bone marrow stromal cells. *Graft* 2000; 3(6): 278–83.
15. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Гололобов В.Г. и др. Участие трансфузированных клеток костного мозга в репаративном остеогистогенезе. Цитология 2005; 46(9): 755–9.
16. Marino R., Martinez C., Boyd K. et al. Transplantable marrow osteoprogenitors engraft in discrete saturable sites in the marrow microenvironment. *Exp. Hematol.* 2008; 36(3): 360–8.
17. Otsuru S., Hofmann T.J., Rasini V. et al. Osteopoietic engraftment after bone marrow transplantation: effect of inbred strain of mice. *Exp. Hematol.* 2010; 38(9): 836–44.
18. Dominici M., Marino R., Rasini V. et al. Donor cell-derived osteopoiesis originates from a self-renewing stem cell with a limited regenerative contribution after transplantation. *Blood* 2008; 111(8): 4386–91.

Поступила 4.03.2011