

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.419-018.46:602.9

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2025-22-1-57-64>

Поступила в редакцию 16.04.2024

Received 16.04.2024

А. А. Жерносеченко, Я. И. Исайкина*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь*

ЭФФЕКТ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ В ХОНДРОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Аннотация. Мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) обладают уникальными функциональными свойствами, в частности способностью дифференцироваться в хондрогенном направлении. Благодаря этому данная популяция клеток широко востребована при репарации хрящевой ткани. Различные комбинации ростовых факторов не только способствуют экспрессии генов-маркеров гиалинового хряща, но и индуцируют маркеры, ассоциированные с гипертрофией. Есть данные, что аскорбиновая кислота может стимулировать хондрогенную дифференцировку МСК за счет увеличения транскрипции генов коллагенов *Col2*. В связи с этим изучено влияние аскорбиновой кислоты при ее добавлении в дифференцировочную среду к ранее разработанному коктейлю цитокинов с целью получения гиалиноподобного матрикса. Ввиду спорного времени индукции процесса хондрогенеза в МСК сделано предположение о возможности сокращения срока индукции хондрогенной преддифференцировки МСК.

На основе проведенных исследований подтверждено положительное влияние аскорбиновой кислоты на экспрессию гена *Col2*, что свидетельствует об образовании гиалиноподобной хрящевой ткани при хондрогенной дифференцировке МСК. Анализ экспрессии генов-маркеров хондрогенной дифференцировки МСК и синтеза компонентов внеклеточного матрикса на 4-е и 7-е сутки показал возможность сокращения срока преддифференцировки до 4 сут.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые/стромальные клетки, хондрогенная дифференцировка, аскорбиновая кислота

Для цитирования: Жерносеченко, А. А. Эффект аскорбиновой кислоты на получение преддифференцированных в хондрогенном направлении мезенхимальных стволовых/стромальных клеток / А. А. Жерносеченко, Я. И. Исайкина // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2025. – Т. 22, № 1. – С. 57–64. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2025-22-1-57-64>

Hanna A. Zhernasechanka, Yanina I. Isaikina*Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, v. Borovliany,
Minsk Region, Republic of Belarus*

EFFECT OF ASCORBIC ACID ON OBTAINING CHONDROGENIC PRE-DIFFERENTIATED MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS

Abstract. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have unique functional properties, one of which is the chondrogenic differentiation. This population of cells is being used in clinical practice for repairing cartilage tissue. Various combinations of growth factors promote the expression of markers of hyaline cartilage, but also induce hypertrophy's markers. There is evidence that ascorbic acid can promote chondrogenic differentiation of MSCs by increasing the transcription of *Col2*, so we have studied when adding ascorbic acid to the differentiation medium to the previously developed cytokine cocktail in order to obtain a hyaline-like matrix. There is a different time of induction of chondrogenesis in MSCs, so we assumed to reduce the induction period of chondrogenic pre-differentiation of MSCs. Based on our studies we confirmed a positive effect of ascorbic acid on the expression of *Col2*, which indicates the possibility of obtaining strong and stable chondrogenic differentiation of MSCs. The analysis of the expression of genes-markers of chondrogenic differentiation of MSCs and the synthesis of extracellular matrix components on the 4th and 7th days showed a possibility of reducing the pre-differentiation period to 4 days.

Keywords: mesenchymal stem/stromal cells, chondrogenic differentiation, ascorbic acid

For citation: Zhernasechanka H. A., Isaikina Ya. I. Effect of ascorbic acid on obtaining chondrogenic pre-differentiated mesenchymal stem/stromal cells. *Vesti Natsyyanal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya medytsynskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2025, vol. 22, no. 1, pp. 57–64 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2025-22-1-57-64>

Введение. А. J. Friedenstein с соавт. [1] были первыми исследователями, которые описали популяцию выделенных из костного мозга веретенообразных, колониеобразующих, способных адгезировать к пластику фибробластов. Позднее благодаря А. I. Caplan [2] эти клетки получили название «мезенхимальные стволовые клетки» (МСК). В настоящее время источником получения данной популяции клеток являются костный мозг, жировая ткань, плацента, пуповинная кровь, пульпа зуба, кожа и подкожная клетчатка, слюнные железы, печень, легкие, менструальная кровь, периферическая кровь, обонятельная выстилка и т. д. [3–7].

В 2006 г. Международное общество клеточной терапии (ISCT, англ. *International Society for Cellular Therapy*) предложило обязательные критерии для подтверждения принадлежности клеток к МСК: наличие адгезивных свойств; экспрессия поверхностных молекул CD105, CD73 и CD90 и отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79 α или CD19 и HLA-DR; способность к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях *in vitro* [8].

Благодаря своим уникальным функциональным свойствам (мультипотентности, высокой пролиферативной активности, гипои иммуногенности, трофической способности, иммуномодулирующей активности) МСК находят широкое клиническое применение в иммуносупрессивной и противовоспалительной терапии, поддержке гемопоэза, репарации органов и тканей и др. [9].

Научный интерес вызывают исследования по изучению различных условий направленной хондрогенной дифференцировки МСК. Исследователи экспериментально подбирают и анализируют эффективность различных факторов и их комбинаций в качестве хондроиндукторов [10], оценивают продолжительность воздействия ростовых факторов с целью включения их в программы хондрогенной дифференцировки в МСК [11].

Время индукции процесса хондрогенеза в МСК спорно. Есть данные, что это происходит на 2–5-е [11], 8-е [12] или 10-е [13] сутки от начала культивирования в присутствии ростовых факторов. Согласно Т. Branly с соавт., время дифференцировки МСК с 14-х по 28-е сутки является уже периодом синтеза компонентов внеклеточного матрикса [14].

Одной из сложностей *in vitro* хондрогенной дифференцировки МСК является получение гипертрофированных хондроцитоподобных клеток, которые впоследствии могут подвергаться апоптозу и кальцификации [15, 16].

Анализируя различные комбинации 5 ростовых факторов – TGF β (англ. *transforming growth factor beta*), BMP (англ. *bone morphogenetic protein*), дексаметазона, IGF (англ. *insulin-like growth factor*), FGF (англ. *fibroblast growth factor*), – R. B. Jakobsen с соавт. отметили, что, несмотря на то что все факторы способствуют экспрессии генов-маркеров гиалинового хряща (*Agg* (кодирует агрекан), *Col2* (кодирует коллаген II типа), *Col11* (кодирует коллаген XI типа), *COMP* (англ. *cartilage oligomeric matrix protein*, кодирует одноименный белок), представленные факторы также индуцировали ассоциированные с гипертрофией маркеры – *Col10* (кодирует коллаген X типа), *RUNX2* (англ. *runt-related transcription factor 2*, кодирует одноименный белок) [10].

На сегодняшний день нет однозначного ответа на вопрос, почему в процессе хондрогенной дифференцировки МСК параллельно происходит экспрессия *Col2* и *Col10*. Есть мнение, что это обусловлено особенностями метилирования гена *Col10* в МСК [17]. Согласно другой точке зрения, это следствие изменения пространственно-временного влияния Sox9 (англ. *SRY-Box transcription factor 9*) на экспрессию генов *Col10*, который присутствует *in vivo*, но отсутствует *in vitro*. Поэтому в результате *in vitro* дифференцировки МСК экспрессируют *Col2* и *Col10* одновременно [18].

Аскорбиновая кислота (витамин С) может способствовать хондрогенной дифференцировке МСК за счет увеличения транскрипции генов коллагенов и стимулирования выработки внеклеточного матрикса (коллагена II типа и агрекана), а также за счет ингибирования пролиферации фибробластов (что косвенно поддерживает образование гиалинового хряща) и подавления апоптоза МСК. Считается, что после трансплантации в дефекты хряща более 50 % трансплантированных клеток подвергаются апоптозу [19]. К негативному эффекту применения аскорбиновой кислоты можно отнести то, что она способствует активации остеобласт-специфических генов, таких как *Col1* [20].

Цель исследования – изучить влияние аскорбиновой кислоты и возможность сокращения срока индукции хондрогенной преддифференцировки мезенхимальных стволовых/стромальных

клеток для усовершенствования метода получения *in vitro* хондрогенно преддифференцированных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

Материалы и методы исследования. *Получение МСК из костного мозга доноров.* Для получения МСК моноклеарные клетки (МНК) выделяли из проб костного мозга на гистопакет плотностью 1,077 г/мл (Sigma-Aldrich, США), отмывали в 0,9%-м NaCl (ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов», Беларусь), ресуспендировали в IMDM (Life technologies, США) с 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой (Life technologies, США) и переносили в концентрации $(2-3) \cdot 10^6$ /мл во флакон с площадью поверхности 25 см² (Sarstedt, Германия). Клетки инкубировали при +37 °C и 5 % CO₂ (Nuair, США), со сменой среды через каждые 3 дня. При получении 80–90%-го конфлюэнтного слоя МСК дезадгезировали 0,25%-м трипсином-ЭДТА (Sigma, США), отмывали в 0,9%-м NaCl и переносили во флаконы с площадью поверхности 75 см² в количестве $0,5 \cdot 10^6$ для экспансии. Таким образом проводили 2 или 3 пассажа.

Оценка жизнеспособности МСК. Для анализа жизнеспособности в центрифужную пробирку вносили 20 мкл суспензии клеток и 20 мкл 0,4%-го раствора трипанового синего, тщательно ресуспендировали содержимое пробирки. При помощи светового микроскопа визуально подсчитывали в камере Горяева окрашенные (мертвые) и неокрашенные (живые) клетки в количестве не менее 100. Рассчитывали коэффициент жизнеспособности клеток в процентах от общего подсчитанного числа клеток.

Иммунофенотипический анализ МСК. Окраску клеток моноклональными антителами CD105, CD90, CD73, CD34, CD14, меченными PE, и CD45, меченными FITC (Beckman Coulter), осуществляли по стандартной методике. Оценку неспецифического связывания моноклональных антител учитывали с использованием изотипического контроля. К образцу (100–200 тыс. клеток) добавляли 20 мкл специфических моноклональных антител и изотипического контроля и инкубировали в темноте при комнатной температуре 25–30 мин. После инкубации с антителами клетки дважды отмывали в фосфатном буфере, центрифугируя 5 мин при 300 g. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре NAVIOS с использованием программы CellQuestPro (США). Для каждого образца анализировали не менее 10 тыс. клеток. Дополнительно регистрировали параметры прямого и бокового светорассеяния клеток.

Дифференцировка МСК в хондрогенном направлении в 2D-культуре. Использовали МСК 2-го или 3-го пассажей. Для получения монослойной 2D-культуры МСК культивировали в аналогичной среде DMEM, содержащей 1 % антибиотика (Life technologies, США), 10 нг/мл TGFβ3 (Life technologies, США), 100 нг/мл IGF (Life technologies, США), 100 нмоль дексаметазона (Sigma-Aldrich, США) и 50 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США), в течение 7 сут. Смену среды проводили на 3–4-е сутки.

Метод иммунофлуоресцентного окрашивания. Метод использовали для изучения накопления белков внеклеточного матрикса. Материалом являлись культуры клеток на 4-е и 7-е сутки культивирования. Для проведения исследования образцов проводили пермеабиллизацию клеток 0,1%-м Triton X-100. Затем готовые к окрашиванию образцы 2 ч инкубировали при +4 °C с раствором первичных антител: анти-Aggrecan (1 : 100) и анти-COL2A1 (1 : 50) (Life technologies, США). Добавляли раствор вторичных антител: меченных Nothern Lihgt 637 (1 : 100) и AlexaFluor 488 (1 : 400) (Life technologies, США). Через 1 ч образцы отмывали, добавляли пропидиум йодид для окрашивания клеточных ядер и анализировали с помощью конфокального сканирующего лазерного микроскопа Leica (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Метод количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Методом количественной ПЦР в реальном времени определяли экспрессию генов *Col2*, *Coll*, *Coll10*, *Sox9*, *Agg*, *Coll1*, *COMP*, *Ver* в образцах МСК. Методом обратной транскрипции проводили синтез комплементарных цепочек ДНК, используя в качестве матрицы выделенную РНК, для чего 1 мкг РНК в концентрации 0,1 мкг/мкл воды денатурировали в течение 10 мин при 70 °C. Затем аликвоту РНК, охлажденную на льду, вносили в смесь для обратной транскрипции (4 мкл 5-кратного буфера для обратной транскриптазы (Promega, США), 2 мкл 10 ммоль смеси дезнуклеотидтрифосфатов, 1 мкл 50 ммоль случайных праймеров (рэндом гексамеров) (Invitrogen, США), 0,5 мкл ингибитора рибонуклеаз в концентрации 40 Ед/мкл, 1 мкл 200 Ед/мкл обратной транскриптазы

MMLV (Promega, США) и 1,5 мкл воды и инкубировали, используя следующую программу: 20 °C – 10 мин, 42 °C – 45 мин, 99 °C – 3 мин. Разводили кДНК водой до конечного объема 50 мкл. В работе использовали праймеры к исследуемым генам. С помощью онлайн-программ Primer3Plus® (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) и PrimerBlast® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) осуществляли дизайн праймеров таким образом, чтобы они отжигались в наиболее консервативных участках при температуре 60 °C. В качестве контрольного использовали ген *ABL*, при этом значение экспрессии генов рассчитывали как отношение экспрессии интересующих генов по отношению к контрольному. В качестве флуоресцентного красителя использовали SYBR Green. Реакционную смесь готовили с помощью набора QuantiTect SYBR Green PCR Kits (QIAGEN, США). ПЦР проводили как однокомпонентную реакцию (в каждой пробирке праймеры к одной мишени). Условия проведения реакции были следующими: 50 °C – 2 мин, 95 °C – 15 мин, 94 °C – 15 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с. Анализ специфичности амплификации проверяли по кривым плавления.

Методы статистической обработки данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica 7.0 (StatSoft, США), Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США). Значения показателей представлены в виде медианы (Me), интерквартильный размах – в виде 25-го и 75-го перцентилей. Для анализа данных использовали непараметрический Wilcoxon Matched Pairs Test. При уровне значимости $p < 0,05$ различия показателей считали достоверными.

Результаты и их обсуждение. Ранее нами был разработан *in vitro* метод получения биомедицинского клеточного продукта на основе преддифференцированных МСК костного мозга, который включал в себя применение комплекса ростовых факторов TGFβ3/IGF в условиях монослойной культуры в течение 7 сут [21].

С целью усовершенствования полученного ранее метода нами изучено влияние аскорбиновой кислоты при ее добавлении в культуральную среду и сокращение срока дифференцировки на хондрогенную преддифференцировку МСК.

С этой целью получены культуры МСК костного мозга от здоровых доноров ($n = 12$). Полученная популяция клеток имела характерный иммунофенотип (более 90 % клеток экспрессировали антигены CD90, CD105, CD73, менее 2 % – CD14) и обладала жизнеспособностью 96,5 (95,0; 98,0) %.

Для оценки влияния аскорбиновой кислоты на хондрогенную преддифференцировку МСК проведен сравнительный анализ экспрессии генов-маркеров *Col2*, *Coll*, *Coll10*, *Sox9*, *Coll1* в клетках, которые были культивированы в хондрогенной среде в присутствии и в отсутствие аскорбиновой кислоты (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Экспрессия генов в МСК после культивирования в присутствии и в отсутствие аскорбиновой кислоты *in vitro*

Table 1. Gene expression in MSC after culture in the presence and in the absence of ascorbic acid *in vitro*

Ген-маркер	Относительный уровень экспрессии, Me (25 %; 75 %)		<i>p</i>
	при культивировании с аскорбиновой кислотой	при культивировании без аскорбиновой кислоты	
<i>Col2</i>	0,002 (0,002; 0,007)	0,001 (0,001; 0,002)	0,03*
<i>Coll</i>	39,56 (11,43; 187,39)	32,90 (20,39; 187,40)	0,86
<i>Coll10</i>	0,02 (0,003; 0,148)	0,001 (0,0004; 0,025)	0,06
<i>Sox9</i>	0,69 (0,31; 0,95)	0,60 (0,24; 0,85)	0,87
<i>Coll1</i>	0,049 (0,02; 0,33)	0,037 (0,01; 0,09)	0,67

П р и м е ч а н и е. * – достоверность различий ($p < 0,05$).

Согласно полученным данным, в культурах клеток в присутствии аскорбиновой кислоты отмечена более высокая экспрессия *Col2*, но не выявлено статистически значимых различий между относительными уровнями экспрессии *Coll*, *Coll10*, *Sox9*, *Coll1*.

В нативной хрящевой ткани содержание коллагена II типа составляет приблизительно 95 %, а его синтез является доказательством формирования гиалинового хряща [22] и стабильности полученной ткани. Считается, что основным недостатком при создании биоинженерного хряща является низкое количество коллагенов, поэтому более значимую положительную экспрессию *Col2* в культурах МСК с добавлением аскорбиновой кислоты можно рассматривать как наиболее предпочтительное сочетание ростовых факторов для получения стабильной популяции хондро-бластоподобных клеток.

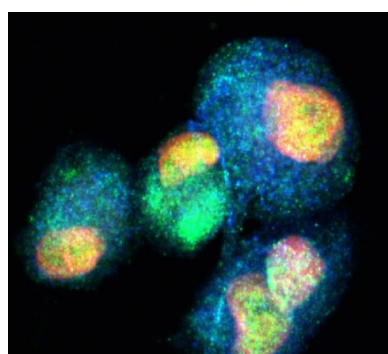
F. Langenbach с соавт. показали, что аскорбиновая кислота значительно увеличивает экспрессию *Coll* при остеогенной дифференцировке [20], но при добавлении аскорбиновой кислоты к коктейлю ростовых факторов при хондрогенной дифференцировке данный эффект нами не отмечен. Коллаген I типа способствует образованию фиброзного хряща, который не способен противостоять естественным нагрузкам. Физиологическая нагрузка на сустав сохраняет хондроцитарный фенотип, а смещение или растяжение могут стимулировать оссификацию.

Так как имеются данные о том, что хондрогенная преддифференцировка МСК может начаться уже на 2–5-е сутки, было выдвинуто предположение, что срок культивирования МСК в хондрогенной среде в разработанном ранее методе получения преддифференцированных МСК можно сократить до 4 сут. Поэтому был проведен сравнительный анализ экспрессии генов-маркеров *Col2*, *Coll*, *Coll10*, *Sox9*, *Agg*, *Coll1*, *COMP*, *Ver* на 4-е и 7-е сутки хондрогенной дифференцировки МСК. Проанализированы маркеры ранней хондрогенной дифференцировки *Col2*, *Coll1* и *Sox9*, маркер волокнистого хряща *Coll*, маркер гипертрофии *Coll10*. При анализе экспрессии генов-маркеров хондрогенеза на 4-е и 7-е сутки не выявлено статистически значимых различий ни в одном из исследованных генов (табл. 2).

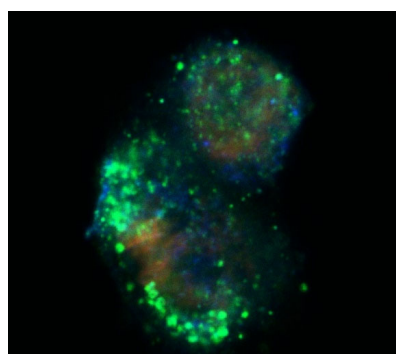
Т а б л и ц а 2. Экспрессия генов в МСК на 4-е и 7-е сутки хондрогенной дифференцировки *in vitro*

Table 2. Gene expression in MSC on the 4th and 7th day of chondrogenic differentiation *in vitro*

Ген-маркер	Относительный уровень экспрессии, Ме (25 %; 75 %)		<i>p</i>
	на 4-е сутки	на 7-е сутки	
<i>Col2</i>	0,01 (0,001; 0,36)	0,003 (0,0004; 0,84)	0,98
<i>Coll</i>	451,9 (263,2; 962,1)	187,4 (1,42; 903,89)	0,30
<i>Coll10</i>	0,06 (0,001; 0,93)	0,002 (0,001; 0,02)	0,25
<i>Sox9</i>	0,56 (0,279; 0,90)	0,39 (0,20; 0,63)	0,28
<i>Agg</i>	0,67 (0,51; 1,58)	1,14 (0,38; 1,89)	0,96
<i>Coll1</i>	0,28 (0,03; 0,81)	0,10 (0,02; 0,38)	0,13
<i>COMP</i>	19,74 (4,85; 25,28)	5,58 (0,28; 25,81)	0,27
<i>Ver</i>	11,32 (5,1; 16,4)	9,00 (0,11; 17,03)	0,44



a



b

Иммунофлуоресцентное окрашивание (зеленый – коллаген II, синий – агрекан, красный – ядра клеток) компонентов внеклеточного матрикса при хондрогенной преддифференцировке МСК на 4-е (*a*) и 7-е (*b*) сутки *in vitro*. ×400

Immunofluorescent staining (green – collagen II, blue – aggrecan, red – cell nuclei) of extracellular matrix components during chondrogenic MSCs predifferentiation on 4th (*a*) and 7th (*b*) days *in vitro*. ×400

Изучено также накопление компонентов внеклеточного матрикса – агрекана и коллагена IIa1 типа.

Структуру суставного хряща можно разделить на две основные составляющие – хондроциты (около 1 %) и внеклеточный матрикс. Внеклеточный матрикс, в свою очередь, также можно разделить – на коллагеновые волокна, которые переплетены в трехмерную сеть, и основное вещество, состоящее из протеогликанов и воды. Основной задачей волокнистой сети является удержание других молекул посредством механических и электростатических связей. Протеогликаны в суставном хряще представлены в форме больших агрегатов, основу которых составляет связанный с гиалуроновой кислотой агрекан, обладающий способностью образовывать нерастворимую при физиологических условиях конструкцию [23].

Результаты исследования накопления белков на различных стадиях хондрогенной дифференцировки МСК методом иммунофлуоресцентного окрашивания с последующим анализом на конфокальном сканирующем лазерном микроскопе показали, что во всех образцах клетки активно синтезируют коллаген IIa1 типа и агрекан на 4-е и 7-е сутки преддифференцировки (рисунок), в отличие от исходной культуры на 0-е сутки (данные не представлены). При этом внутриклеточная локализация белков отмечалась без секреции данных компонентов внеклеточного матрикса (коллагена IIa1 типа и агрекана) во внеклеточное пространство.

Отсутствие достоверных различий в экспрессии основных генов-маркеров на 4-е и 7-е сутки, а также наличие синтеза компонентов внеклеточного матрикса на 4-е и 7-е сутки направленной хондрогенной преддифференцировки МСК позволяет сократить время культивирования в хондрогенной среде до 4 сут.

Заключение. Результаты исследования по изучению влияния аскорбиновой кислоты на хондрогенную преддифференцировку МСК показали положительное влияние аскорбиновой кислоты на экспрессию *Col2*, что подтверждает возможность получения гиалиноподобной ткани.

Анализ экспрессии генов-маркеров хондрогенной дифференцировки МСК и синтеза компонентов внеклеточного матрикса на 4-е и 7-е сутки показал возможность сокращения срока дифференцировки до 4 сут.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Научное исследование проведено при поддержке гранта Президента Республики Беларусь.

Acknowledgements. The research was carried out with the support of a grant from the President of the Republic of Belarus.

Список использованных источников

1. Friedenstein, A. J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells / A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, K. S. Lalykina // Cell and Tissue Kinetics. – 1970. – Vol. 3, N 4. – P. 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
2. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells / A. I. Caplan // Journal of Orthopaedic Research. – 1991. – Vol. 9, N 5. – P. 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
3. Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical applications / W.-Z. Zhuang, Y.-H. Lin, L.-J. Su [et al.] // Journal of Biomedical Science. – 2021. – Vol. 28, N 1. – Art. 28. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00725-7>
4. Роль мезенхимальных стволовых клеток в поддержании жизнеспособности и функциональной активности культуры гепатоцитов *in vitro* / А. А. Коритко, С. И. Кривенко, А. Е. Щерба [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя медыцынскіх навук. – 2017. – № 1. – С. 7–14.
5. Оптимизация протоколов дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в клетки костной и хрящевой ткани для использования в клинической практике: отчет о НИР / С. М. Космачева, Д. Л. Дубовик, С. И. Игнатенко [и др.]; Респ. науч.-практ. центр трансфузиологии и мед. биотехнологий; рук.: Г. Я. Хулуп, И. Д. Волоотовский. – Минск, 2015. – URL: http://med.by/dmn/book.php?book=15-18_5 (дата обращения: 22.11.2024).
6. Терапия хронических стенозов трахеи гортани мезенхимальными стволовыми клетками: результаты двухлетнего наблюдения / Н. Г. Антонец, А. Е. Гончаров, В. Л. Чекан [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя медыцынскіх навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 417–426.
7. Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation / T. Assis-Ribas, M. F. Forni, S. M. B. Winischofer [et al.] // Developmental Biology. – 2018. – Vol. 437, N 2. – P. 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.03.002>
8. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, N 4. – P. 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

9. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cell subpopulations: Comparison of bone marrow and adipose tissue / H. Busser, M. Najar, G. Raicevic [et al.] // *Stem Cells and Development*. – 2015. – Vol. 24, N 18. – P. 2142–2157. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0172>
10. Analysis of the effects of five factors relevant to *in vitro* chondrogenesis of human mesenchymal stem cells using factorial design and high throughput mRNA-profiling / R. B. Jakobsen, E. Østrup, X. Zhang [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, N 5. – P. e96615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096615>
11. Ruhl, T. Quantification of chondrogenic differentiation in monolayer cultures of mesenchymal stromal cells / T. Ruhl, J. P. Beier // *Analytical Biochemistry*. – 2019. – Vol. 582. – Art. 113356. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113356>
12. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components / F. Barry, R. E. Boynton, B. Liu, J. M. Murphy // *Experimental Cell Research*. – 2001. – Vol. 268, N 2. – P. 189–200. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>
13. Chondrogenic predifferentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels / F. Fensky, J. C. Reichert, A. Traube [et al.] // *Biomedical Engineering*. – 2014. – Vol. 59, N 5. – P. 375–383. <https://doi.org/10.1515/bmt-2013-0076>
14. Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation: influence of culture time, transforming growth factors and type I collagen siRNAs on the differentiation index / T. Branly, R. Contentin, M. Desancé [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, N 2. – Art. 435. <https://doi.org/10.3390/ijms19020435>
15. The regulatory role of signaling crosstalk in hypertrophy of MSCs and human articular chondrocytes / L. Zhong, X. Huang, M. Karperien, J. N. Post // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16, N 8. – P. 19225–19247. <https://doi.org/10.3390/ijms160819225>
16. TGF- β -induced chondrogenesis in co-cultures of chondrocytes and mesenchymal stem cells on biodegradable scaffolds / R. L. Dahlin, M. Ni, V. V. Meretoja [et al.] // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, N 1. – P. 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.086>
17. Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter / P. Zimmermann, S. Boeuf, A. Dickhut [et al.] // *Arthritis and Rheumatism*. – 2008. – Vol. 58, N 9. – P. 2743–2753. <https://doi.org/10.1002/art.23736>
18. Independent chondrogenic potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in monolayer expansion cultures decreases in a passage-dependent pattern / E. C. Bwalya, H. S. Wijekoon, J. Fang [et al.] // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2018. – Vol. 80, N 11. – P. 1681–1687. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0202>
19. Ascorbic acid and iron supplement treatment improves stem cell-mediated cartilage regeneration in a minipig model / A. J. Theruvath, E. E. Mahmoud, W. Wu [et al.] // *American Journal of Sports Medicine*. – 2021. – Vol. 49, N 7. – P. 1861–1870. <https://doi.org/10.1177/03635465211005754>
20. Langenbach, F. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro* / F. Langenbach, J. Handschel // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2013. – Vol. 4, N 5. – Art. 117. <https://doi.org/10.1186/scrt328>
21. Жерносеченко, А. Влияние комбинации ростовых факторов TGF β и IGF на хондрогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток костного мозга / А. Жерносеченко, Я. Исайкина, Т. Филипович // *Наука и инновации*. – 2021. – № 2. – С. 78–83.
22. Mahmoudifar, N. Chondrogenesis and cartilage tissue engineering: the longer road to technology development / N. Mahmoudifar, P. M. Doran // *Trends in Biotechnology*. – 2012. – Vol. 30, N 3. – P. 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.09.002>
23. Articular cartilage: from formation to tissue engineering / S. Camarero-Espinosa [et al.] // *Biomaterials Science*. – 2016. – Vol. 4, N 5. – P. 734–767. <https://doi.org/10.1039/C6BM00068A>

References

1. Friedensteyn A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 1970, vol. 3, no. 4, pp. 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
2. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 1991, vol. 9, no. 5, pp. 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
3. Zhuang W.-Z., Lin Y.-H., Su L.-J., Wu M.-S., Jeng H.-Y., Chang H.-C., Huang Y.-H., Ling T.-Y. Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical applications. *Journal of Biomedical Science*, 2021, vol. 28, no. 1, art. 28. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00725-7>
4. Koritko A. A., Krivenko S. I., Shcherba A. E., Primakova E. A., Gomom A. A., Petrovskaya E. G., Dedyulya N. I., Buzuk E. S. Role of mesenchymal stem cells in maintaining the viability and functional activity of hepatocyte culture *in vitro*. *Vestsi Natsyyanal'най akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*, 2017, no. 1, pp. 7–14 (in Russian).
5. Kosmacheva S. M., Dubovik D. L., Ignatenko S. I., Severin I. N., Kuvyrkov E. V., Khulup G. Ya. *Optimization of protocols for the differentiation of mesenchymal stem cells into cells of bone and cartilage tissue for use in clinical practice*. Available at: http://med.by/dmn/book.php?book=15-18_5 (accessed 22.11.2024) (in Russian).
6. Antonevich N. G., Goncharov A. E., Chekan V. L., Shulepova E. A., Rynda E. G. Therapy of chronic stenosis of laryngotracheal stenosis with the use of mesenchymal stem cells: two-year observation results. *Vestsi Natsyyanal'най*

akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 417–426 (in Russian.)

7. Assis-Ribas T., Forni M. F., Winnischofer S. M. B., Sogayar M. C., Trombetta-Lima M. Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation. *Developmental Biology*, 2018, vol. 437, no. 2, pp. 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.03.002>

8. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, vol. 8, no. 4, pp. 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

9. Busser H., Najjar M., Raicevic G., Pieters K., Velez Pombo R., Philippart P., Meuleman N., Bron D., Lagneaux L. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cell subpopulations: Comparison of bone marrow and adipose tissue. *Stem Cells and Development*, 2015, vol. 24, no. 18, pp. 2142–2157. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0172>

10. Jakobsen R. B., Østrup E., Zhang X., Mikkelsen T. S., Brinchmann J. E. Analysis of the effects of five factors relevant to *in vitro* chondrogenesis of human mesenchymal stem cells using factorial design and high throughput mRNA-profiling. *PloS One*, 2014, vol. 9, no. 5, p. e96615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096615>

11. Ruhl T., Beier J. P. Quantification of chondrogenic differentiation in monolayer cultures of mesenchymal stromal cells. *Analytical Biochemistry*, 2019, vol. 582, art. 113356. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113356>

12. Barry F., Boynton R. E., Liu B., Murphy J. M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental Cell Research*, 2001, vol. 268, no. 2, pp. 189–200. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>

13. Fensky F., Reichert J. C., Traube A., Rackwitz L., Siebenlist S., Nöth U. Chondrogenic predifferentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering*, 2014, vol. 59, no. 5, pp. 375–383. <https://doi.org/10.1515/bmt-2013-0076>

14. Branly T., Contentin R., Desancé M., Jacquet T., Berton L., Jacquet S. [et al.]. Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation: Influence of culture time, transforming growth factors and type I collagen siRNAs on the differentiation index. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, no. 2, art. 435. <https://doi.org/10.3390/ijms19020435>

15. Zhong L., Huang X., Karperien M., Post J. N. The regulatory role of signaling crosstalk in hypertrophy of MSCs and human articular chondrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, vol. 16, no. 8, pp. 19225–19247. <https://doi.org/10.3390/ijms160819225>

16. Dahlin R. L., Ni M., Meretoja V. V., Kasper F. K., Mikos A. G. TGF- β -induced chondrogenesis in co-cultures of chondrocytes and mesenchymal stem cells on biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, 2014, vol. 35, no. 1, pp. 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.086>

17. Zimmermann P., Boeuf S., Dickhut A., Boehmer S., Olek S., Richter W. Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter. *Arthritis and Rheumatism*, 2008, vol. 58, no. 9, pp. 2743–2753. <https://doi.org/10.1002/art.23736>

18. Bwalya E. C., Wijekoon H. S., Fang J., Kim S., Hosoya K., Okumura M. Independent chondrogenic potential of canine marrow-derived mesenchymal stem cells in monolayer expansion cultures decreases in a passage-dependent pattern. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2018, vol. 80, no. 11, pp. 1681–1687. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0202>

19. Theruvath A. J., Mahmoud E. E., Wu W., Nejadnik H., Kiru L., Liang T., Felt S., Daldrop-Link H. E. Ascorbic acid and iron supplement treatment improves stem cell-mediated cartilage regeneration in a minipig model. *American Journal of Sports Medicine*, 2021, vol. 49, no. 7, pp. 1861–1870. <https://doi.org/10.1177/03635465211005754>

20. Langenbach F., Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro*. *Stem Cell Research and Therapy*, 2013, vol. 4, no. 5, art. 117. <https://doi.org/10.1186/scrt328>

21. Zhernosechenko A., Isaikina Ya., Filipovich T. Effect of a combination of TGF β and IGF growth factors on the chondrogenic potential of mesenchymal bone marrow stem cells. *Nauka i innovatsii* [Science and innovations], 2021, no. 2, pp. 78–83 (in Russian).

22. Mahmoudifar N., Doran P. M. Chondrogenesis and cartilage tissue engineering: the longer road to technology development. *Trends in Biotechnology*, 2012, vol. 30, no. 3, pp. 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.09.002>

23. Camarero-Espinosa S., Rothen-Rutishauser B., Fosterac E. J., Weder Ch. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomaterials Science*, 2016, vol. 4, no. 5, pp. 734–767. <https://doi.org/10.1039/C6BM00068A>

Информация об авторах

Жерносеченко Анна Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0009-0006-9593-7067>. E-mail: sapphire.anna@gmail.com

Исайкина Янина Ивановна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-5196-8554>. E-mail: yaninai@mail.ru

Information about the authors

Hanna A. Zhernasechanka – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0009-0006-9593-7067>. E-mail: sapphire.anna@gmail.com

Yanina I. Isaikina – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-5196-8554>. E-mail: yaninai@mail.ru