

**АГЛЯДЫ**  
**REVIEWS**

УДК 616.419-018.4+60]:616.71-018.4-003.93  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-500-508>

Поступила в редакцию 03.06.2020  
Received 03.06.2020

**А. А. Жерносеченко**

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

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОСТЕОГЕННОМ ПОТЕНЦИАЛЕ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И СОЗДАНИИ  
БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ РЕПАРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ**

**Аннотация.** В статье суммируются современные представления об остеогенном потенциале мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и опыте применения различных носителей для восстановления костной ткани. Понимание реализации программы остеогенеза в МСК сможет существенно расширить возможности применения этих клеток в составе биоинженерных конструкций. На сегодняшний день накоплен большой объем экспериментальных данных по изучению механизма остеогенной дифференцировки МСК, индукторов трансформации МСК в предшественники остеогенеза и созданию эквивалентов костной ткани биоинженерным путем с применением различных носителей. Особое внимание уделяется разработке материалов носителей и их проектированию, методам получения конструкций и взаимодействиям между скэффолдом и клетками, так как это имеет большое значение для дальнейшего функционирования биоинженерной ткани.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, остеогенная дифференцировка, носитель

**Для цитирования:** Жерносеченко, А. А. Современные представления об остеогенном потенциале мезенхимальных стволовых клеток и создании биоинженерных конструкций для репарации костной ткани / А. А. Жерносеченко // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 500–508. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-500-508>

**Hanna A. Zhernasechanka**

*Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,  
v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus*

**MODERN CONCEPTS OF THE OSTEOGENIC POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS  
AND THE CREATION OF BIOENGINEERING STRUCTURES FOR BONE TISSUE REPAIR**

**Abstract.** The following review summarizes the latest studies on *in vitro* osteogenic mesenchymal stem cell differentiation and selection of scaffolds that can maintain the viability and functional activity of these cells for bone tissue repair. In the last time, there have been investigated a lot of issues such as the stimulation and development osteogenic differentiation of MSCs, the growth factors – inducers of osteogenesis in MSCs, the creation of 3D constructions of cells in different scaffolds. A deeper understanding of the osteogenic differentiation mechanisms can result in the novel therapeutic opportunities of bone disease treatment. Special attention is given to materials for scaffold designs and template–cell interactions, which is of great importance for the structuring and functioning of an engineered tissue.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, scaffold

**For citation:** Zhernasechanka H. A. Modern concepts of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells and the creation of bioengineering structures for bone tissue repair. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 500–508 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-500-508>

Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток (МСК) впервые была описана Friedenstein с соавт. в конце 1960-х – начале 1970-х годов. Так как первые МСК были выделены из костного мозга, то естественно наличие высокого потенциала дифференцировки у этих клеток в остеогенном направлении. В настоящее время известно, что МСК обладают высокой пластичностью, но впервые была описана именно остеогенная дифференцировка этих клеток [1–3]. Первоначально для подтверждения получения *in vitro* из МСК предшественников остеоцитов оценивали синтез клетками щелочной фосфатазы, переход проколлагена I типа под влиянием аскорбиновой кислоты в коллаген I типа, его депонирование во внеклеточном матриксе, богатом ростовыми факторами и протеинами [1, 4]. Последующие исследования выявили и другие маркеры остеогенеза, такие как остеокальцин, остеопонин, остеоонектин, а в финальной фазе развития остеобластов – гидроксипатит [1, 4].

В состав внеклеточного матрикса нативной костной ткани входят фибриллярные структуры, 90 % из которых представлены коллагеном I типа, а также минорными коллагенами V и XII типа. Основная функция коллагенов заключается в поддержании адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток в остеоциты, а кроме того, они придают прочность и эластичность костной ткани. Коллаген V типа связан с гепарансульфатсодержащими протеогликанами, молекулами тромбоспондина и другими белками межклеточного матрикса. Коллаген XII типа взаимодействует с хондротинсульфатсодержащими протеогликанами, фибронектином, а также принимает участие в связывании межклеточных структур с клеточными элементами кости, выступая посредником между клетками и волокнами коллагенов I и V типа с неколлагеновыми протеинами [5]. Неколлагеновый компонент внеклеточного матрикса представлен гликопротеинами (остеоонектин, фибронектин, ламинин), фосфопротеинами (остеопонтин) и протеогликанами (декорин), которые выполняют различные функции. Так, фибронектин, ламинин, остеоонектин являются адгезивными белками. Остеокальцин – белок, связывающий и транспортирующий кальций, – прочно взаимосвязан с гидроксипатитом. Остеопонин и остеоонектин участвуют в минерализации внеклеточного костного матрикса [5].

В начале процесса остеодифференцировки МСК *in vitro* важным моментом является наработка клетками коллагена I типа и его секреция во внеклеточный матрикс, который максимально аккумулируется уже после первой недели дифференцировки [1, 6]. Со второй недели начинается минерализация внеклеточного матрикса [4]. После формирования конфлюэнтного монослоя клетки приобретают чувствительность к дифференцировочным агентам, поэтому этап пролиферации до начала минерализации является критическим моментом в плане объема получаемой костной ткани [1, 7, 8]. В серии исследований *in vitro* было показано, что остеогенез может быть индуцирован путем добавления питательных веществ и гидрокортизона, доказательством чего служил синтез щелочной фосфатазы, внеклеточного матрикса и внутриклеточного фосфата кальция [9].

Остеогенез является линейно последовательным процессом, контролируемым серией генов, при котором клетки проходят этапы созревания от остеопрогениторных клеток, преостеобластов, остеобластов до остеоцитов. При этом остеогенные клетки синтезируют белки, формирующие внеклеточный матрикс, в котором затем депонируется фосфат кальция в форме кристаллов гидроксипатита. В начале остеогенной дифференцировки важные изменения можно отметить в морфологии МСК. Так, клетки изменяют форму от фибробластоподобной до близкой к шаровидной [10, 11]. Согласно литературным данным, на остеодифференцировку МСК влияют два типа воздействия – химические сигналы и физическое напряжение цитоскелета клеток [5].

Стабильность костной ткани сохраняется и регулируется комплексом взаимосвязей между остеобластами, остеоцитами и остеокластами. Остеобласты принимают участие в протеиновом синтезе, поддержании секреции матрикса и формировании здоровой ткани. В процессе минерализации некоторые зрелые остеобласты встраиваются в окружающий их матрикс и становятся основными компонентами зрелой костной ткани – остеоцитами, контактирующими друг с другом посредством отростков. Остеокласты, являясь специализированными макрофагами, вырабатывают спектр протеолитических ферментов и обеспечивают резорбцию костного матрикса, участвуя таким образом в обновлении костной ткани при ремоделировании кости. Хотя точный

молекулярный механизм неизвестен, было показано, что остециты могут прямо или опосредованно (через Wnt сигнальный путь) регулировать активность остеобластов и остеокластов [12].

На сегодняшний день признано три транскрипционных фактора, которые оказывают наибольшее влияние на регуляцию остеогенной дифференцировки МСК: Runx2 (Runt-связанный транскрипционный фактор 2), Sp7 (или osterix (Osx)) и Dlx5 (Distal-less homeobox 5) [12].

В зависимости от этапа дифференцировки Runx2 регулирует и индуцирует экспрессию определенных молекулярных маркеров. Так, в начале реализации программы остеогенеза поддерживается экспрессия генов, ответственных за пролиферацию, прогрессию клеточного цикла и биосинтез внеклеточного матрикса. Позднее гены, ответственные за пролиферацию, подавляются, но в то же время происходит стимулирование генов, контролирующих созревание и организацию внеклеточного матрикса [12–14].

Первые данные о роли Runx2 в дифференцировке МСК в остеобласты были получены в 1997 г. [12]. Активность Runx2 зависит от его концентрации и времени дифференцировки. В начале дифференцировки отмечается его высокий уровень, а на поздних стадиях, начиная со стадии зрелых остеобластов, он постепенно снижается до полного отсутствия на стадии финальных остеоцитов [12, 15]. Кроме того, высокий уровень Runx2 на поздних стадиях дифференцировки оказывает ингибиторный эффект, результатом чего становится редукция костной массы [12, 16].

Runx2 стимулирует экспрессию генов, характерных для костной ткани, таких как фактор транскрипции Osx, коллаген типа  $\alpha 1$  (*Coll1a1*), остеокальцин и костный сиалопротеин. Runx2, ALP, Coll1, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ 1), остеоонектин и костный морфогенетический белок (BMP-2) являются ранними маркерами остеодифференцировки, остеокальцин и остеоопонтин экспрессируются позднее [6].

Индукцируемые МСК экспрессируют транскрипционные факторы Sox9 и Runx2. Sox9 является преимущественно маркером хондрогенной дифференцировки, а Runx2 – остеогенной. Sox9 напрямую влияет на Runx2 и подавляет его активность. Экспериментально на мышах было показано, что снижение Sox9 является триггером остеогенеза, так как клетки дифференцируются в остеогенном направлении тогда, когда Sox9 экспрессируется на более низком уровне, чем Runx2. Ингибиторный эффект Sox9 на созревание остеобластов через подавление Runx2 – это основной механизм для определения остеохондрогенной судьбы клеток [17–19].

Кроме того, соотношение экспрессии генов *Runx2/Sox9* можно считать индикатором остеогенной чувствительности доноров. Было показано, что высокое соотношение *Runx2/Sox9* на 7-й день приводит к высокой активности щелочной фосфатазы на 14-й день, а  $^{45}\text{Ca}$  инкорпорации – на 28-й день [17].

Osx был идентифицирован около 10 лет назад. Согласно современным исследованиям, он вовлечен в переключение клеток на остеогенную дифференцировку, играет важную роль в гомеостазе костной ткани, ингибирует поздние стадии остеогенеза. Ингибиторный эффект Osx подобен Runx2 [12, 20]. Sp7 стимулирует экспрессию генов коллагена I типа, костного сиалопротеина, остеоопонтина, остеоонектина, остеокальцина [5].

Еще одним транскрипционным фактором, который регулирует дифференцировку остеобластов в остеокласты, является Dlx5 – ключевой белок, регулирующий созревание остеобластов, который действует на ранних стадиях остеодифференцировки [5]. Dlx5 активируется BMP-2 [11, 21], а затем сам активирует Runx2 [22]. Кроме того, он способен стимулировать экспрессию ALP и остеокальцина Runx2-независимым путем [23]. Под влиянием гена Dlx5 экспрессируется также Sp7.

МСК, полученные из костного мозга, демонстрируют более высокий потенциал дифференцировки в остеогенном направлении, чем МСК, полученные из жировой ткани [9]. Остеогенная дифференцировка МСК *in vitro* легко стимулируется в монослойной культуре клеток путем добавления  $\beta$ -глицеролфосфата, гидрокортизона или дексаметазона и аскорбиновой кислоты.  $\beta$ -глицеролфосфат выступает в роли источника фосфата для минерализации костной ткани и индуцирует экспрессию остеогенных генов [7]. Дексаметазон – ключевой фактор, который индуцирует остеогенную дифференцировку путем регулирования экспрессии основного фактора остеогенной дифференцировки Runx2 [7], а кроме того, он обеспечивает минерализацию *in vitro* [17].

Аскорбиновая кислота способствует активации остеобластспецифических генов и является необходимым кофактором для ферментов, которые гидроксилируют пролин и лизин в проколлагене, обеспечивая таким образом секрецию Coll1 во внеклеточный матрикс. При ее отсутствии гидроксирования пролина не происходит и цепи коллагена не способны сформировать свойственную им спиральную структуру [7]. Протоколы остеогенной дифференцировки, включающие применение дексаметазона, аскорбиновой кислоты и  $\beta$ -глицеролфосфата, часто применяют в экспериментальных тканеинженерных методиках или для подтверждения пластичности МСК, полученных из различных источников [7].

ВМР – семейство ростовых факторов, локализованных в деминерализованном матриксе костной ткани, которые стимулируют дифференцировку остеобластов в остециты и могут быть использованы при остеоиндукции в исследованиях по восстановлению костной ткани [12]. ВМР участвуют в двух работающих синергично сигнальных путях индукции экспрессии транскрипционных факторов Runx2, Osx и Dlx5: белок связывается с рецепторами на клетках-предшественниках остеобластов, что обеспечивает фосфорилирование белков цитоплазмы Smad-1, Smad-5, Smad-8, индуцирующих экспрессию генов остеогенеза, второй путь – через запуск системы передачи сигнала от рецепторов ВМР по каскадному принципу активации протеинкиназ к транскрипционным факторам, отвечающим за остеогенез [5]. Применение ВМР в качестве фактора дифференцировки увеличивает экспрессию как ранних остеобластспецифических маркеров, таких как щелочная фосфатаза, так и поздних – остеокальцина, остеопонина [24–26]. Тем не менее ряд авторов подтверждают дифференцировку МСК в остеогенном направлении и в отсутствие представителей ВМР-семейства [27–29].

Индукторами остеогенеза в МСК могут выступать и другие ростовые факторы: представители суперсемейства TGF $\beta$ , инсулиноподобный трансформирующий фактор 1 (IGF-1), ростовой фактор фибробластов (FGF), факторы роста тромбоцитов (PDGF) и факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) [12, 30].

Реконструкция обширного участка костной ткани требует тканеинженерного подхода, т. е. создания клеточной конструкции на основе носителя, при этом актуальным является сохранение жизнеспособности и функциональной активности клеток. Таким образом, материал, выбранный в качестве матрицы, играет ключевую роль, так как является каркасом, на котором будет происходить рост и образование костной ткани. Идеальный носитель для МСК должен обладать рядом характеристик: способностью к высокой клеточной адгезии и к сохранению клеток в имплантате; способностью к сохранению пролиферативного потенциала; биосовместимостью, предотвращающей иммунные реакции у реципиента после имплантации; остеоиндуктивностью; биопроводимостью, обеспечивающей свободную диффузию питательных веществ и кислорода; структурой и механическими свойствами, сходными с таковыми в нативной костной ткани. Кроме того, он должен обладать способностью поддерживать васкуляризацию и степень деградации носителя, соотносимую с образованием новой костной ткани [9, 11, 31].

Таким образом, выбор клеточного носителя для создания биотрансплантата имеет первостепенное значение в исследованиях различных скэффолдов с целью их дальнейшего применения в клинической практике.

Сегодня наиболее часто используются фибриновый гель, кальций фосфат, альгинат-гидрогель, бета-трикальцийфосфат, гидроксипатит, коллаген.

Фибрин – это натуральный фиброзный высокомолекулярный протеин, включенный в процесс свертывания крови. Он полимеризуется из фибриногена под воздействием фермента тромбина в сетчатую структуру и формирует гемостатический сгусток совместно с тромбоцитами над раневой поверхностью. Фибриновый матрикс способен поддерживать как пролиферацию, так и дифференцировку внесенных в него МСК. Кроме того, его преимуществом является способность сформировать непрерывную границу с костной тканью в месте имплантации [32].

Кальций фосфат – один из неорганических материалов, обнаруженных в костной ткани и обладающих биосовместимостью и остеоиндуктивностью [9]. Установлено, что кальций фосфат не только является матрицей для МСК, но может стимулировать остеогенную дифференцировку клеток, а также содействовать образованию костной ткани *in vivo* [33].

Синтетический бета-трикальцийфосфат – это безводный фосфат кальция, который создан в качестве заменителя костной ткани для устранения дефектов кости. Высокая пористость материала способствует легкому проникновению внутрь клеток, нанесенных на его поверхность, и хорошей диффузии биологических жидкостей. Эти характеристики определяют его использование в различных исследованиях в качестве клеточного носителя при репарации костной ткани.

Альгинат-гидрогель – натуральный полимер, получаемый из бурых водорослей. Существует способ доставки клеток в составе альгинатных микрошариков и кальция фосфата, который является составной частью нативной костной ткани [32].

Н. Yuan с соавт. были исследованы два типа трикальций фосфата –  $\alpha$ -ТСП и  $\beta$ -ТСП. Данные носители были имплантированы в спинную мускулатуру собак. Гистологический анализ на 30, 45 и 150-е сутки выявил более высокое заселение клетками внутри пор  $\beta$ -ТСП, чем при применении  $\alpha$ -ТСП. Отмечалось также образование костной ткани на 45-е и 150-е сутки при использовании  $\beta$ -ТСП, чего не наблюдалось при анализе  $\alpha$ -ТСП. С другой стороны, костная ткань при применении  $\beta$ -ТСП на 150-е сутки имела дегенеративные признаки [34]. J. Liu с соавт. [35] изучали влияние  $\alpha$ -ТСП на остеогенную дифференцировку МСК у крыс. МСК крыс в синтетическом  $\alpha$ -ТСП инкубировали в остеоиндуктивной среде с последующим анализом уровня экспрессии генов *ALP*, *Runx2*, *Coll1* и *Sp7* ПЦР-методом. Было установлено, что  $\alpha$ -ТСП имеет хорошую биосовместимость с МСК крыс и в присутствии остеоиндукционной среды способствует росту уровней mRNA *ALP*, *Runx2*, *Coll1* и *Sp7*. После 21 дня культивирования наблюдали образование кальция.

Гидроксид фосфат кальция (гидроксиапатит) составляет около 50 % костной ткани. Поэтому искусственно созданный гидроксиапатит наряду с  $\beta$ -ТСП находит широкое применение в регенеративной медицине и травматологии для заполнения костных дефектов. Н. Yuan с соавт. имплантировали в спинную мускулатуру собак гидроксиапатит с крупными порами, стенки которых имели неровности и содержали микропоры (S-НА), а также другой вариант гидроксиапатита – с гладкими стенками пор с равномерно распределенными в них кристаллическими зернышками (J-НА). Спустя 3 и 6 мес. после введения проводили гистологический и микрорадиографический анализ. При использовании S-НА отмечалось формирование костной структуры и последующее ее увеличение к 6-му месяцу. В то же время при использовании J-НА не выявлено формирования костной структуры ни на 3-й, ни на 6-й месяц наблюдений. Это исследование показало, что архитектура гидроксиапатита, используемого в качестве носителя, влияет на остеоиндуктивные свойства, которые может развить данный носитель [36].

Götz W. с соавт. исследовали остеоиндуктивные свойства коммерческого продукта NanoBone®, представляющего собой нанокристаллический гидроксиапатит, встроенный в кварцевый гелематрикс. Данный носитель был имплантирован подкожно и внутримышечно в спинную область 18 свинок. Через 5 и 10 недель, 4 и 8 мес. исследуемые области были изучены с помощью гистологического и гистоморфометрического методов. Признаки раннего остеогенеза с последующим его усилением внутри и вокруг гранул наблюдались уже через 5 недель, а формирование костноподобных структур – на поздних сроках [37].

Коллаген – отличный кандидат для 3D-носителя, поскольку, являясь нативным компонентом костной ткани, обладает биосовместимостью, биodeградируемостью, способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку МСК. Но слабые механические свойства не позволяют использовать коллаген в качестве 3D-носителя, поэтому его модифицируют путем добавления полимеров или других биомолекул [38]. Так, G. Calabrese с соавт. [39] продемонстрировали высокий остеогенный потенциал МСК жировой ткани в составе носителя из комбинации коллагена и Mg-примесного гидроксиапатита. Примечательно, что МСК дифференцировались во взрослые остеобласты даже в отсутствие специфических индукционных факторов, а добавление ростовых факторов заметно ускоряло остеогенный процесс. J. I. Dawson с соавт. [40] показали, что матрица на основе коллагена I типа с включенными в ее состав кристаллами гидроксиапатита способна поддерживать остеодифференцировку МСК человека, что подтверждает интенсивный синтез клетками щелочной фосфатазы и внеклеточного матрикса с локализованными участками остеокальцина.

Таким образом, накоплен большой объем данных экспериментальных исследований по изучению механизмов остеогенной дифференцировки МСК и индукторов их трансформации в предшественники остеогенеза и по созданию эквивалентов костной ткани биоинженерным путем с применением различных носителей. Сегодня с участием небольшого числа пациентов проводятся многочисленные клинические исследования по изучению регенерации костной ткани, и в случае эффективности проводимых исследований полученные результаты могут стать основой для расширения методов оказания помощи в травматологии и ортопедии.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### Список использованных источников

1. Hanna, H. *In vitro* osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties / H. Hanna, L. M Mir // *Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – Art. 203. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>
2. 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 // *Cell Proliferation.* – 1970. – Vol. 3, N 4. – P. 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
3. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues / A. J. Friedenstein [et al.] // *Transplantation.* – 1968. – Vol. 6, N 2. – P. 230–247.
4. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development / L. D. Quarles [et al.] // *J. Bone Miner Res.* – 1992. – Vol. 7, N 6. – P. 683–692. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070613>
5. Камилов, Ф. Х. Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и ее регуляция / Ф. Х. Камилов Е. Р. Фаршатова, Д. А. Еникеев // *Фунд. исслед.* – 2014. – № 7-4. – С. 836–842.
6. Vater, C. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells / C. Vater, P. Kasten, M. Stiehler // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7, N 2. – P. 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037>
7. Langenbach, F. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro* / F. Langenbach, J. Handschel // *Stem Cell Res. Ther.* – 2013. – Vol. 4, N 5. – Art. 117. <https://doi.org/10.1186/scrt328>
8. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach / C. Granéli [et al.] // *Stem Cell Res.* – 2014. – Vol. 12, N 1. – P. 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.009>
9. Osteoblast-oriented differentiation of BMSCs by co-culturing with composite scaffolds constructed using silicon-substituted calcium phosphate, autogenous fine particulate bone powder and alginate *in vitro* / Y. Tian [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 51. – P. 88308–88319. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19015>
10. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation / P. Rodríguez [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2004. – Vol. 93, N 4. – P. 721–731. <https://doi.org/10.1002/jcb.20234>
11. Жерносеченко, А. Выбор носителя и условий дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток для восстановления костной ткани / А. Жерносеченко, Я. Исайкина, Т. Михалевская // *Наука и инновации.* – 2019. – № 5. – С. 58–61.
12. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells from basic knowledge, animal models to clinical trials / G. Hutchings [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2020. – Vol. 9, N 1. – Art. 139. <https://doi.org/10.3390/jcm9010139>
13. Role and regulation of Runx2 in osteogenesis / M. Bruderer [et al.] // *Eur. Cell. Mater.* – 2014. – Vol. 28. – P. 269–286. <https://doi.org/10.22203/ecm.v028a19>
14. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression / G. S. Stein [et al.] // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23. – P. 4315–4329. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207676>
15. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation / M. H. Lee [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 1999. – Vol. 73, N 1. – P. 114–125.
16. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures / W. Liu [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 155, N 1. – P. 157–166. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105052>
17. *In vitro* osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio / C. Loebel [et al.] // *Tissue Eng. Part A.* – 2015. – Vol. 21, N 1–2. – P. 115–123. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0096>
18. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors / H. Akiyama [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102, N 41. – P. 14665–14670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504750102>
19. Dominance of Sox9 function over Runx2 during skeletogenesis / G. Zhou [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103, N 50. – P. 19004–19009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605170103>
20. SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice / C. A. Yoshida [et al.] // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7, N 3. – P. e32364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032364>
21. BMP signals regulate Dlx5 during early avian skull development / N. Holleville [et al.] // *Dev. Biol.* – 2003. – Vol. 257, N 1. – P. 177–189. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00059-9)
22. BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network / M. Q. Hassan [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, N 52. – P. 40515–40526. <https://doi.org/10.1074/jbc.m604508200>

23. Heo, J. S. Distal-less homeobox 5 is a master regulator of the osteogenesis of human mesenchymal stem cells / J. S. Heo, S. G. Lee, H. O. Kim // *Int. J. Mol. Med.* – 2017. – Vol. 40, N 5. – P. 1486–1494. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3142>
24. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation / M. Beederman [et al.] // *J. Biomed. Sci. Eng.* – 2013. – Vol. 6, N 8A. – P. 32–52. <https://doi.org/10.4236/jbise.2013.68a1004>
25. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells / H. H. Luu [et al.] // *J. Orthop. Res.* – 2007. – Vol. 25, N 5. – P. 665–677. <https://doi.org/10.1002/jor.20359>
26. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells / Q. Kang [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2009. – Vol. 18, N 4. – P. 545–559. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0130>
27. PDGF, TGF- $\beta$ , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages / F. Ng [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol. 112, N 2. – P. 295–307. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-103697>
28. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after Injection / A. Leboviev [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2015. – Vol. 6, N 1. – Art. 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0036-y>
29. Protocols for *in vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages / M. Ch. Ciuffreda [et al.] // *Mesenchymal stem cells: methods and protocols, methods in molecular biology* / ed. M. Gneccchi. – N. Y., 2016. – Vol. 1416. – P. 149–158.
30. How does the pathophysiological context influence delivery of bone growth factors? / X. Yu [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2015. – Vol. 84. – P. 68–84. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.010>
31. Мурзич, А. Э. Экспериментальное обоснование способа аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток для регенерации костной ткани головки бедра / А. Э. Мурзич, Л. А. Пашкевич, А. А. Жерносеченко // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 7–19.
32. Zhou, H. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering / H. Zhou, H. H. K. Xu // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32, N 30. – P. 7503–7513. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.045>
33. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling / Y.-R. V. Shih [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111, N 3. – P. 990–995. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321717111>
34. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP / H. Yuan [et al.] // *J. Mater. Sci Mater Med.* – 2001. – Vol. 12, N 1. – P. 7–13. <https://doi.org/10.1023/A:1026792615665>
35. The effect of synthetic  $\alpha$ -tricalcium phosphate on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells / J. Liu [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2015. – Vol. 7, N 9. – P. 1588–1601.
36. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics / H. Yuan [et al.] // *Biomaterials.* – 1999. – Vol. 20, N 19. – P. 1799–1806. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00075-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00075-7)
37. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig / W. Götz [et al.] // *Folia Histochemica et Cytobiologica.* – 2010. – Vol. 48, N 4. – P. 589–596. <https://doi.org/10.2478/v10042-010-0096-x>
38. Polo-Corrales, L. Scaffold Design for Bone Regeneration / L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, J. E. Ramirez-Vick // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2014. – Vol. 14, N 1. – P. 15–56. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>
39. Collagen-hydroxyapatite scaffolds induce human adipose derived stem cells osteogenic differentiation *in vitro* / G. Calabrese [et al.] // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11, N 3. – P. e0151181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151181>
40. Development of specific collagen scaffolds to support the osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells / J. I. Dawson [et al.] // *Biomaterials.* – 2008. – Vol. 29, N 21. – P. 3105–3116. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.040>

## References

1. Hanna H., Mir L. M. *In vitro* osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018, vol. 9, no. 1, art. 203. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>
2. Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of Guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 1970, vol. 3, no. 4, pp. 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
3. Friedenstein A. J., Petrakova K. V., Kurolesova A. I., Frolova G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 1968, vol. 6, no. 2, pp. 230–247.
4. Quarles L. D., Yohay D. A., Lever L. W., Caton R., Wenstrup R. J. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1992, vol. 7, no. 6, pp. 683–692. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070613>
5. Kamilov F. Kh., Farshatova E. R., Enikeev D. A. Cell-molecular mechanisms of bone tissue remodeling and its regulation. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental research], 2014, no. 7-4, pp. 836–842 (in Russian).
6. Vater C., Kasten P., Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 2011, vol. 7, no. 2, pp. 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037>
7. Langenbach F., Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro*. *Stem Cell Research and Therapy*, 2013, vol. 4, no. 117. <https://doi.org/10.1186/scrt328>
8. Granéli C., Thorfve A., Ruetschi U., Brisby H., Thomsen P., Lindahl A., Karlsson C. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Research*, 2014, vol. 12, no. 1, pp. 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.009>

9. Tian Y., Cui L.-H., Xiang S.-Y., Xu W.-X., Chen D.-Ch., Fu R., Zhou Ch.-L., Liu X.-Q., Wang Y.-F., Wang X.-T. Osteoblast-oriented differentiation of BMSCs by co-culturing with composite scaffolds constructed using silicon-substituted calcium phosphate, autogenous fine particulate bone powder and alginate *in vitro*. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 51, pp. 88308–88319. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19015>
10. Rodríguez P., González M., Ríos S., Cambiazo V. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004, vol. 93, no. 4, pp. 721–731. <https://doi.org/10.1002/jcb.20234>
11. Zhernosechenko A., Isaikina Ya., Mikhalevskaya T. The choice of scaffold and conditions for mesenchymal stem cells differentiation for the bone repair. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2019, no. 5, pp. 58–61 (in Russian).
12. Hutchings G., Moncrieff L., Dompe C., Janowicz K., Sibiak R., Bryja A. [et al.]. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells from basic knowledge, animal models to clinical trials. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, vol. 9, no. 1, art. 139. <https://doi.org/10.3390/jcm9010139>
13. Bruderer M., Richards R. G., Alini M., Stoddart M. J. Role and regulation of Runx2 in osteogenesis. *European Cells and Materials*, 2014, vol. 28, pp. 269–286. <https://doi.org/10.22203/ecm.v028a19>
14. Stein G. S., Lian J. B., van Wijnen A. J., Stein J. L., Montecino M., Javed A., Zaidi S. K., Young D. W., Choi J.-Y., Pockwinse S. M. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*, 2004, vol. 23, pp. 4315–4329. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207676>
15. Lee M. H., Javed A., Kim H. J., Shin H. I., Gutierrez S., Choi J. Y., Rosen V., Stein J. L., van Wijnen A. J., Stein G. S., Lian J. B., Ryoo H. M. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1999, vol. 73, no. 1, pp. 114–125.
16. Liu W., Toyosawa S., Furuichi T., Kanatani N., Yoshida C., Liu Y., Himeno M., Narai S., Yamaguchi A., Komori T. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *Journal of Cell Biology*, 2001, vol. 155, pp. 157–166. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105052>
17. Loebel C., Czekanska E. M., Bruderer M., Salzmann G., Alini M., Stoddart M. J. In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. *Tissue Engineering. Part A*, 2015, vol. 21, no. 1–2, pp. 115–123. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0096>
18. Akiyama H., Kim J.-E., Nakashima K., Balmes G., Iwai N., Deng J. M., Zhang Z., Martin J. F., Behringer R. R., Nakamura T., de Crombrughe B. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no. 41, pp. 14665–14670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504750102>
19. Zhou G., Zheng Q., Engin F., Munivez E., Chen Y., Sebald E., Krakow D., Lee B. Dominance of Sox9 function over Runx2 during skeletogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no. 50, pp. 19004–19009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605170103>
20. Yoshida C. A., Komori H., Maruyama Z., Miyazaki T., Kawasaki K., Furuichi T. [et al.] SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *Public Library of Science One*, 2012, vol. 7, no. 3, p. e32364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032364>
21. Holleville N., Quilhac A., Bontoux M., Monsoro-Burq A.-H. BMP signals regulate Dlx5 during early avian skull development. *Developmental Biology*, 2003, vol. 257, no. 1, pp. 177–189. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00059-9)
22. Hassan M. Q., Tare R. S., Lee S. H., Mandeville M., Morasso M. I., Javed A., van Wijnen A. J., Stein J. L., Stein G. S., Lian J. B. BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, no. 52, pp. 40515–40526. <https://doi.org/10.1074/jbc.m604508200>
23. Heo J. S., Lee S. G., Kim H. O. Distal-less homeobox 5 is a master regulator of the osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, vol. 40, no. 5, pp. 1486–1494. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3142>
24. Beederman M., Lamplot J. D., Nan G., Wang J., Liu X., Yin L. [et al.]. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2013, vol. 6, no. 8A, pp. 32–52. <https://doi.org/10.4236/jbise.2013.68a1004>
25. Luu H. H., Song W.-X., Luo X., Manning D., Luo J., Deng Z.-L., Sharff K. A., Montag A. G., Haydon R. C., He T.-Ch. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 2007, vol. 25, no. 5, pp. 665–677. <https://doi.org/10.1002/jor.20359>
26. Kang Q., Song W.-X., Luo Q., Tang N., Luo J., Luo X. [et al.]. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells and Development*, 2009, vol. 18, no. 4, pp. 545–559. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0130>
27. Ng F., Boucher S., Koh S., Sastry K. S. R., Chase L., Lakshminpathy U., Choong C., Yang Z., Vemuri M. C., Rao M. S., Tanavde V. PDGF, TGF- $\beta$ , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 2, pp. 295–307. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-103697>
28. Lebouvier A., Poignard A., Cavet M., Amiaud J., Leotot J., Hernigou P., Rahmouni A., Bierling P., Layrolle P., Rouard H., Chevallier N. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Research and Therapy*, 2015, vol. 6, no. 1, art. 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0036-y>
29. Ciuffreda M. Ch., Malpasso G., Musarò P., Turco V., Gnechi M. Protocols for *in vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York, 2016, vol. 1416, pp. 149–158.

30. Yu X., Suárez-González D., Khalil A. S., Murphy W. L. How does the pathophysiological context influence delivery of bone growth factors? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, vol. 84, pp. 68–84. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.010>
31. Murzich A. E., Pashkevich L. A., Zhernosechenko A. A. Experimental justification of the method of mesenchymal stem cell autotransplantation for regeneration of the femoral head bone tissue. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 7–19 (in Russian).
32. Zhou H., Xu H. H. K. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 30, pp. 7503–7513. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.045>
33. Shih Y.-R. V., Hwang Y., Phadke A., Kang H., Hwang N. S., Caro E. J. [et al.]. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, vol. 111, no. 3, pp. 990–995. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321717111>
34. Yuan H., De Bruijn J. D., Li Y., Feng J., Yang Z., De Groot K., Zhang X. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2001, vol. 12, no. 1, pp. 7–13. <https://doi.org/10.1023/A:1026792615665>
35. Liu J., Zhao L., Ni L., Qiao Ch., Li D., Sun H., Zhang Z. The effect of synthetic  $\alpha$ -tricalcium phosphate on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. *American Journal of Translational Research*, 2015, vol. 7, no. 9, pp. 1588–1601.
36. Yuan H., Kurashina K., de Bruijn J. D., Li Y., de Groot K., Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 1999, vol. 20, no. 19, pp. 1799–1806. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00075-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00075-7)
37. Götz W., Lenz S., Reichert C., Henkel K.-O., Bienengraber V., Pernicka L., Gundlach K. K. H., Gredes T., Gerber T., Gedrange T., Heinemann F. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2010, vol. 48, no. 4, pp. 589–596. <https://doi.org/10.2478/v10042-010-0096-x>
38. Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J. E. Scaffold design for bone regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014, vol. 14, no. 1, pp. 15–56. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>
39. Calabrese G., Giuffrida R., Fabbi C., Figallo E., Furno D. L., Gulino R., Colarossi C., Fullone F., Giuffrida R., Parenti R., Memeo L., Forte S. Collagen-hydroxyapatite scaffolds induce human adipose derived stem cells osteogenic differentiation *in vitro*. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 3, p. e0151181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151181>
40. Dawson J. I., Wahl D. A., Lanham S. A., Kanczler J. M., Czernuszka J. T., Oreffo R. O. C. Development of specific collagen scaffolds to support the osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 2008, vol. 29, no. 21, pp. 3105–3116. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.040>

### Информация об авторе

Жерносеченко Анна Александровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: sapphire.anna@gmail.com

### Information about the author

Hanna A. Zhernasechanka – Researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Boroveryany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: sapphire.anna@gmail.com