

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Ревокатова Д.П., Зурина И.М., Горкун А.А., Сабурин И.Н.

## Современные подходы к созданию васкуляризированных костных биоэквивалентов

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Восстановление структуры и функциональной активности костной ткани при переломах и системных заболеваниях скелета является актуальной проблемой, решение которой позволит улучшить качество и продолжительность жизни. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно увеличивается количество сложных случаев переломов, требующих хирургического вмешательства, а также пересадки костной ткани. Существующие методы алло-, ауто- и ксено-трансплантации обладают рядом побочных эффектов, плохо приживаются, вызывают иммунное отторжение, либо не подходят для замещения крупных дефектов. В связи с этим внимание исследователей фокусируется на создании искусственной костной ткани.

Обзор литературы посвящен современным подходам к созданию васкуляризированных костных биоэквивалентов для трансплантации полученных конструктов с целью обеспечения эффективной регенерации костной ткани. Одним из ключевых условий успешного восстановления костной ткани является ангиогенез. В процессе эмбрионального развития остеогенез и ангиогенез тесно связаны. Многие факторы, секретируемые эндотелиальными клетками, запускают процесс остеогенной дифференцировки, воздействуя на ключевые транскрипционные факторы. В свою очередь остеопрогениторные клетки воздействуют на эндотелиальные клетки или их предшественники, стимулируя прорастание кровеносных сосудов в костную ткань. Положительная обратная связь осуществляется за счет взаимной регуляции множества транскрипционных факторов, факторов роста, цитокинов, компонентов внеклеточного матрикса, а также различных микроРНК. Это взаимодействие также играет критическую роль в процессе регенерации костной ткани и заживлении переломов, так как процесс во многом сходен с развитием кости в эмбриогенезе.

В обзоре рассматривается ряд ключевых механизмов взаимодействия ангиогенеза и остеогенеза в процессе эмбриогенеза и регенерации, а также обсуждается проблема использования этих механизмов в тканевой инженерии для лечения переломов и создания васкуляризированных костных биоэквивалентов при восстановлении крупных дефектов кости.

**Ключевые слова:** остеогенез; ангиогенез; мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; регенерация кости; васкуляризация; биопечать; дифференцировка; остеобласты; эндотелиальные клетки; со-культивирование

**Для цитирования:** Ревокатова Д. П., Зурина И.М., Горкун А.А., Сабурин И.Н. Современные подходы к созданию васкуляризированных костных биоэквивалентов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66 (3): 151-165. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.151-165

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Зурина И.М., Горкун А.А., Сабурин И.Н.; написание текста – Ревокатова Д.П.; подготовка иллюстраций – Ревокатова Д. П.; редактирование текста и иллюстраций – Зурина И.М., Горкун А.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Ревокатова Дарья Петровна, e-mail: revokatova.d@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.04.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Revokatova D.P., Zurina I.M., Gorkun A.A., Saburina I.N.

### Modern approaches to bone tissue vascularization

Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Restoration of the structure and functional activity of bone tissue in fractures and systemic skeletal diseases is an important problem, the solution of which will improve quality and expectancy of life. According to the World Health Organization, the number of complicated fractures, that require surgical intervention and bone grafting, increases every year. The existing methods of allo-, auto- and xenotransplantation have several shortcomings, such as immune rejection or unsuitability for replacing large defects.

For this reason, much attention is paid to creation of artificial bone tissue. This review addresses modern approaches to the development of vascularized bone bioequivalents that would provide effective bone tissue regeneration after transplantation of the obtained constructs. Angiogenesis is one of the critical conditions for the successful restoration of bone tissue. During embryonic development, osteogenesis and angiogenesis are closely interrelated. Many factors produced by endothelial cells trigger osteogenic differentiation by affecting the key transcription factors. In turn, osteogenic progenitors influence endothelial cells or their progenitors to stimulate blood vessel growth into the bone tissue. This positive feedback occurs due to the mutual regulation of transcription factors, cytokines, extracellular matrix components, and various microRNAs. This interaction also plays a critical role in bone tissue regeneration and fracture healing since this process is largely similar to the development of bones in embryogenesis. This review describes some of the key mechanisms of the interaction between angiogenesis and osteogenesis and provides examples of a possible use of these mechanisms in tissue engineering to create a vascularized bone bioequivalent to repair large bone defects.

**Keywords:** osteogenesis; angiogenesis; multipotent mesenchymal stromal cells; bone regeneration; vascularization; bioprinting; differentiation; osteoblasts; endothelial cells; co-cultivation

**For citation:** Revokatova D.P., Zurina I.M., Gorkun A.A., Saburina I.N. Modern approaches to bone tissue vascularization. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66 (3): 151-165.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.151-165

**Author's contribution:** concept and design of the research – Zurina I.M., Gorkun A.A., Saburina I.N.; writing the text – Revokatova D.P.; preparing illustrations – Revokatova D.P.; editing of text and illustrations – Zurina I.M., Gorkun A.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** *Daria P. Revokatova*, Junior Researcher, Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: revokatova.d@gmail.com

**Financing.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Information about the authors:**

Revokatova D.P., <https://orcid.org/0000-0002-7539-2403>

Zurina I.M., <https://orcid.org/0000-0002-3275-0215>

Gorkun A.A., <https://orcid.org/0000-0001-5859-812X>

Saburina I.N., <https://orcid.org/0000-0003-2014-2535>

Received 05.04.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

bFGF – основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)

BMP – костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein)

Bsp – костный сиалопротеин (Bone sialoprotein)

CD31 - кластер дифференцировки 31 (cluster of differentiation 31)

CD34 - кластер дифференцировки 34 (cluster of differentiation 34)

Coll - коллаген I типа (Collagen 1)

EMCN - муцин-подобный сиалогликопротеин (mucin-like sialoglycoprotein)

FGF – фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor)

HIF-1 $\alpha$  – фактор, индуцируемый гипоксией (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)

HUVEC – эндотелиальные клетки вены пупочного канатика (Human umbilical vein endothelial cells)

IGF- Инсулиноподобный фактор роста (insulin growth factor)

Msx2 - гомеобоксный белок MSX-2 (Homeobox protein MSX-2)

MyoD – транскрипционный фактор, отвечающий за дифференцировку миоцитов

OC – остеокальцин (Osteocalcin)

ON – остеоонектин

OP – остеопонтин (Osteopontin)

OPG – остеопротегерин

Osx – остерикс (Osterix)

PDGF – тромбоцитарный фактор роста (Platelet-derived growth factor)

PPAR- $\gamma$  - рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором гамма (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

Runx2 – связанный с Runt фактор транскрипции 1 (Runt-related transcription factor 1)

Sox9 - SRY-Box Transcription Factor 9

TGF $\beta$  – трансформирующий фактор роста  $\beta$  (Transforming growth factor beta)

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли (Tumor necrosis factor alpha)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

VEGFR2 (Flk1) – рецептор к VEGF (Vascular endothelial growth factor receptor 2)

$\beta$ -TCP – бета-трикальцийфосфат (beta tricalcium phosphate)

ВКМ – внеклеточный матрикс

КМ – костный мозг

ММСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

ПЭК – предшественники эндотелиальных клеток

СКЖТ – стромальные клетки жировой ткани

## Введение

Кость — сильно васкуляризованная ткань и ее развитие, ремоделирование и регенерация очень зависят от кровоснабжения. В настоящее время именно отсутствие кровеносных сосудов, и, как следствие, гипоксия и гибель клеток, при создании биоэквивалентов является основным фактором, лимитирующим эффективные процессы регенерации костной ткани. Наличие кровеносных сосудов в костной ткани не только обеспечивает снабжение клеток кислородом и питательными веществами, но также осуществляет паракринную регуляцию остеогенеза. Таким образом одной из основных целей при создании костных биоэквивалентов *in vitro* является их предваскуляризация для обеспечения более эффективной регенерации после трансплантации в область дефекта.

В обзоре обсуждаются основные механизмы взаимодействия остеогенеза и ангиогенеза в процессе развития и регенерации костной ткани, а также некоторые стратегии создания васкуляризованных костных биоэквивалентов. Они основаны на использовании факторов роста, различных систем доставки этих факторов, совместном культивировании клеток разного типа, использовании гидрогелей и матриц, а также на построении сосудов методом биопечати.

## Актуальность

Восстановление структуры и функциональной активности костной ткани при травмах, а также системных заболеваниях скелета, является актуальной проблемой общества, решение которой позволит улучшить качество и продолжительность жизни. Так, согласно недавнему исследованию, в 2019 г. в мире было зарегистрировано 178 млн новых переломов, что на 33,4% больше, чем в 1990 г. [1]. Переломы возникают вследствие несчастных случаев или профессиональных травм, например, полученных во время занятий спортом. Кроме того, данный показатель постоянно растет в связи с увеличением продолжительности жизни, что также приводит к росту связанных с лечением медицинских расходов.

К заболеваниям костной ткани, некоторые из которых приводят к высокому риску переломов, относятся

остеопороз, остеонекроз, остеоартрит, ревматоидный артрит, Болезнь Педжета, остеосаркома, иммунные заболевания костей и многое другое. Самой распространенной причиной переломов является остеопороз — метаболическое возраст-ассоциированное заболевание скелета, главной особенностью которого является преобладание процессов резорбции над процессами остеогенеза и нарушение микроархитектуры костной ткани. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в развитых странах около 50% женщин и 20% мужчин старше 50 лет страдают остеопорозом.

Ежегодно в мире проводят около двух миллионов операций по пересадке костной ткани, что является вторым по частоте видом трансплантации после переливания крови [2]. Почти в 50% случаев для пересадки в область перелома используют аутологичный костный материал из подвздошной кости, дистальной части бедренной или проксимального отдела большой берцовой кости пациента. Недостатками ауто-трансплантации являются большое количество побочных эффектов, травма донорского участка и невозможность использовать данный метод для замещения крупных костных дефектов [3]. Еще в 25% случаев проводят алло- и ксенотрансплантации. Костные алло- и ксенотрансплантаты обладают высокой механической прочностью и эффективны при восстановлении массивных костных дефектов, однако довольно долго приживаются из-за тканевой несовместимости и могут осложняться бактериальной или вирусной инфекцией. Во избежание заражения такой материал подвергают серьезной обработке, что также снижает его остеоиндуктивные свойства [4].

Чтобы преодолеть упомянутые выше недостатки ауто-, алло- и ксенотрансплантации, ученые сосредоточили свое внимание на создании искусственной костной ткани. В настоящее время уже в 25% случаев переломов активно применяют синтетические костные трансплантаты, состоящие из прочного остеоиндуктивного матрикса, заполненного разными типами клеток, а также факторами роста [5]. Самыми распространенными синтетическими заменителями являются биоматериалы на основе фосфата кальция, например гидроксиапатит, трикальцийфосфат, биоактивное стекло (синтети-

ческая керамика на силикатной основе), костный цемент из полиметилметакрилата и др. [5]. Тем не менее, поиск новых методов восстановления крупных дефектов костной ткани по-прежнему является актуальной проблемой. Кость является метаболически активной сильно васкуляризованной тканью, в которой лимит диффузии, обеспечивающий формирование остеобластами жизнеспособной структуры, составляет 200 мкм [6]. В связи с этим, основным фактором, лимитирующим эффективные процессы регенерации, является дефицит в искусственном трансплантате кровеносных сосудов и кислорода, что снижает его интеграцию в ткани хозяина и приводит к гибели клеток. Таким образом, одной из основных целей биоинженерии костных биоэквивалентов является их предваскуляризация, для обеспечения которой важно понимать молекулярные механизмы взаимодействия остео- и ангиогенеза в процессе развития и регенерации кости. Данный обзор рассматривает некоторые аспекты дифференцировки остеогенных и эндотелиальных клеток, описывает механизмы их взаимодействия и систематизирует современные подходы создания васкуляризированной костной ткани.

*Развитие костной ткани.* Если рассматривать костную ткань на примере трубчатой кости (например, бедренная кость или фаланги пальцев), то ее можно разделить на внешний — кортикальный слой и внутренний — губчатый. Кортикальная кость очень прочная и состоит из остеонов — костных пластинок, расположенных вокруг Гаверсова канала, в котором проходят кровеносные сосуды и нервы. Губчатая кость пористая, часто содержит красный костный мозг и сильно васкуляризована.

Существует два механизма формирования кости во время эмбрионального развития — за счет эндохондрального или внутримембранного окостенения. Эндохондральное окостенение происходит путем образования хрящевых структур, которые затем заменяются на кальцинированную костную ткань [7]. На первом этапе хондроциты в месте расположения будущего центра первичного окостенения прекращают пролиферировать, становятся гипертрофированными и выделяют проангиогенные факторы (например, фактор роста эндотелия сосудов — VEGF). Под воздействием этих факторов кровеносные сосуды прорастают в область будущего окостенения и образуют там исходную сосудистую сеть [8]. Пришедшие по кровеносным сосудам остеогенные предшественники адгезируются к минерализованному хрящевому матриксу и начинают формировать кость. Таким образом формируются длинные и короткие трубчатые кости, например, бедренная кость и фаланги пальцев [9].

Плоские кости, такие как крыша черепа и лопатки, формируются путем внутримембранного окостене-

ния. В этом случае вначале происходит конденсация мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), которые затем напрямую дифференцируются в остеобласты и начинают вырабатывать внеклеточный матрикс (ВКМ), способствующий формированию костной ткани [9].

*Созревание остеобластов.* Процесс созревания остеобластов длится около 3 нед и включает 3 этапа. На первом этапе клетки синтезируют фибронектин, коллаген I типа (Col1), рецептор к трансформирующему фактору роста (TGF-R) и остеопонтин (OPN). На втором этапе клетки начинают синтезировать щелочную фосфатазу, которая расщепляет фосфатсодержащие вещества для получения свободного фосфата и минерализации костей. На третьем этапе уже зрелые остеобласты синтезируют остеокальцин (OCN) и накапливают фосфат кальция [9].

Остеогенная дифференцировка ММСК контролируется множеством взаимодействующих факторов. Вначале под действием транскрипционного фактора Sox9 происходит конденсация ММСК и хондрогенная дифференцировка клеток. Затем зрелые хондроциты в перихондрии запускают остеогенную дифференцировку ММСК. Нокаут Sox9 приводит к недостатку экспрессии Runx2 — основного фактора, обеспечивающего дифференцировку ММСК в остеогенном направлении. Таким образом Sox9 является самым ранним фактором в молекулярном каскаде дифференцировки остеобластов и в особенности важен для эндохондрального окостенения [10]. Генами-мишенями Runx2 являются остеопонтин (OPN), костный сиалопротеин (Bsp), остеокальцин (OCN), остеопротегерин (OPG) и многие другие. Экспрессия Runx2 также регулируется такими факторами как BMP (костный морфогенетический белок), Wnt, Notch и TGFβ (трансформирующий фактор роста бета) [11]. Другой важный транскрипционный фактор остеогенной дифференцировки — Osterix (Osx) находится под контролем сигнального пути Wnt и необходим для экспрессии таких маркеров остеогенеза как Col1, OCN, Bsp, остеоонектин (ON), OPN, однако никак не влияет на экспрессию Runx2 [12]. BMP-сигналинг находится в начале молекулярного каскада остеогенной дифференцировки и стимулирует пролиферацию и созревание остеогенных предшественников [10]. BMP-2 необходим для экспрессии Osterix и Sox9, а также увеличивает экспрессию гомеобоксного гена *Msx2*, подавляющего адипогенную дифференцировку, воздействуя на фактор PPARγ (рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами). Runx2 так же может ингибировать PPARγ [12]. Большинство факторов, например TGFβ, IGF (инсулиноподобный фактор роста), FGF (фак-

тор роста фибробластов), TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли), влияют на дифференцировку остеобластов, как раз воздействуя на Runx2 и Osterix [9]. Интересно, что оба транскрипционных фактора также являются механически чувствительными, то есть их экспрессия может быть вызвана механическим воздействием на клетки. Показано, что сжатие клеток блокирует миогенную и адипогенную дифференцировку ММСК, подавляя экспрессию *MyoD* (ген, отвечающий за дифференцировку миоцитов) и PPAR $\gamma$ , и в то же время активирует экспрессию Runx2, Osterix, Msx2 и Sox9, стимулируя остеогенную дифференцировку клеток. Растяжение также стимулирует экспрессию Runx2, Osterix, Msx2, щелочной фосфатазы, OCN, Col1. Напряжение сдвига увеличивает экспрессию коллагена I типа, остеокальцина, остеоопонтина [9]. Это объясняет необходимость физической активности для поддержания нормального гомеостаза и регенерации костной ткани.

**Связь остеогенеза и ангиогенеза.** Кровеносные сосуды могут формироваться двумя способами. В раннем эмбриогенезе мезодермальные клетки дифференцируются в гемангиобласты – предшественники эндотелиальных клеток (ПЭК) и клеток крови, которые затем в процессе васкулогенеза мигрируют и формируют примитивные сосуды. На первом этапе мезодермальные ПЭК в ответ на воздействие  $\beta$ FGF и VEGF начинают дифференцироваться в эндотелиальном направлении. Затем эндотелиальные клетки (ЭК) пролиферируют, мигрируют друг к другу, начинают формировать сосуды и выделять тромбоцитарный фактор роста (PDGF), тем самым воздействуя на предшественников перицитов (периваскулярных клеток) через рецептор к PDGF и стимулируя их миграцию в направлении растущих сосудов. Перициты играют важную роль в поддержании сосудов, поскольку их взаимодействие с эндотелиальными клетками приводит к формированию сосудистой базальной мембраны [13]. Однако большинство сосудов, в том числе и в костях, возникает вторым способом, в результате ангиогенеза – разрастания и разветвления существующих сосудистых сетей.

В последние годы уделяется особое внимание взаимодействию между эндотелиальными и остеопрогениторными клетками, так как они всегда располагаются в непосредственной близости друг от друга в местах формирования кости, что указывает на важную роль их правильной коммуникации в заживлении и ремоделировании костной ткани [14]. Взаимодействие между ЭК, остеобластами и хондроцитами в перихондрии имеет решающее значение для начала формирования кости. Выявлено большое количество факторов, обеспечивающих стабильную систему взаиморегуляции остеогенеза и ан-

гиогенеза. Основным фактором, стимулирующим ангиогенез является фактор роста эндотелия сосудов VEGF. Основным рецептором к VEGF является тирозинкиназа VEGFR2 (Flk1). Передача сигналов через Flk1 обеспечивает миграцию, пролиферацию и жизнеспособность эндотелиальных клеток [15]. В процессе эндохондрального окостенения гипертрофические хондроциты секретуют VEGF, который способствует прорастанию сосудов в хрящ, а в процессе регенерации VEGF воздействует на ЭК и стимулирует васкуляризацию костной ткани [16]. VEGF также играет ключевую роль аутокринной регуляции остеогенеза, контролируя миграцию, дифференцировку и жизнеспособность хондроцитов, остеокластов и остеобластов, на поверхности которых также экспрессируется рецептор Flk1 [17]. Кроме того, VEGF ингибирует адипогенную дифференцировку ММСК [18].

Важную роль в регенерации скелетной ткани играет гипоксия. Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1 $\alpha$ ), индуцирует дифференцировку остеопрогениторных клеток и также стимулирует ангиогенез [19], а ингибирование HIF-1 $\alpha$ , напротив, нарушает формирование костей и васкуляризацию [20]. Показано, что предварительное культивирование ММСК в условиях гипоксии индуцирует HIF-1 $\alpha$ -зависимую экспрессию VEGF и  $\beta$ FGF, что улучшает выживаемость клеток, способствует усилению ангиогенеза и остеогенной дифференцировки ММСК и таким образом ускоряет заживление крупных костных дефектов [21].

Фактор BMP также обеспечивает взаимодействие осте- и ангиогенеза. Эндотелиальные клетки продуцируют BMP-2,4,7 и TGF $\beta$ , тем самым контролируя дифференцировку и активность остеобластов [22], а BMP-2 и 7 индуцируют экспрессию VEGF и стимулируют ангиогенез [23]. VEGF усиливает экспрессию BMP-2 в эндотелиальных клетках и модулирует индуцированную BMP-4,6 остеогенную дифференцировку ММСК через Runx2-зависимые механизмы [24].

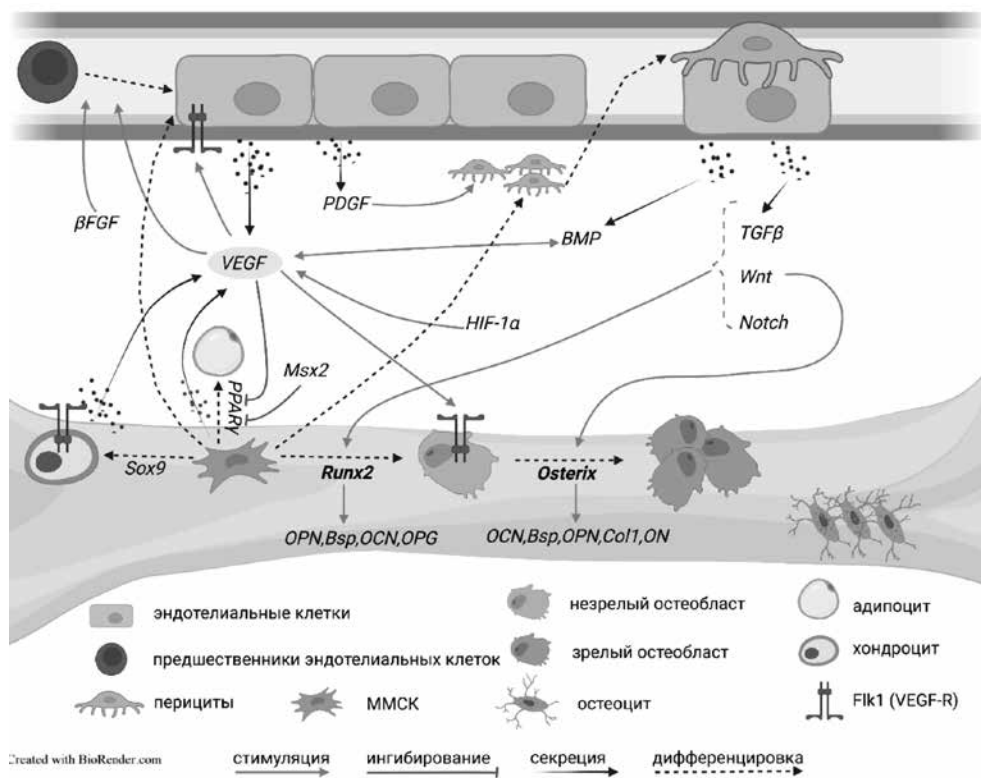
Другой фактор, координирующий осте- и ангиогенез – PDGF. Это основной фактор, который секретируется активированными тромбоцитами для стимуляции механизмов восстановления в травмированных тканях, в том числе и в кости [25]. При повреждении костной ткани высокие концентрации PDGF стимулируют пролиферацию сосудистых перицитов и остеопрогениторных клеток, их миграцию в область повреждения, а также увеличивают минерализацию [25]. При этом ингибирование PDGF приводит к несогласованной миграции перицитов *in vitro* [26]. Таким образом, PDGF также является важным фактором, координирующим ангиогенную и остеогенную дифференцировку.

Регенерация костной ткани во многом повторяет события эмбрионального остеогенеза. Повреждение костной ткани вызывает локальное нарушение сосудистой сети и приводит к гипоксии, которая стимулирует высвобождение проангиогенных факторов, а также к образованию гематомы, воспалению и, как следствие, выделению факторов (BMP, FGF, Wnt и др.), привлекающих в область повреждения остеогенные прогениторные клетки [27]. Заживление переломов регулируется через взаимодействие таких факторов как TGFβ, BMP, FGF, PDGF, Wnt и другими факторами, многие из которых также стимулируют дифференцировку эндотелиальных клеток и васкуляризацию [16]. В месте повреждения ММСК способствуют заживлению переломов, экспрессируя BMP-2, снижая уровень фактора некроза опухоли TNF-α, ингибирующего дифференцировку остеобластов и секретируя иммуно-

модулирующие и антиапоптотические факторы роста и цитокины [28]. ММСК также могут стимулировать ангиогенез паракринным образом, например за счет секреции VEGF, или непосредственно дифференцируясь в эндотелиальные клетки или перicyты [26].

Молекулярные механизмы взаимодействия остеогенеза и ангиогенеза кратко представлены на **рисунке 1**.

*Использование факторов роста для васкуляризации биоэквивалентов костной ткани.* Большинство тканеинженерных конструкций нуждаются в сосудистой сети для снабжения клеток питательными веществами и кислородом. Процесс естественного врастания сосудов в искусственную ткань после трансплантации занимает много времени, что накладывает ограничения на размер конструкции, либо приводит к быстрой гибели клеток трансплантата из-за гипоксии и нехватки питательных веществ. Самые первые попытки стиму-



**Рис. 1.** Молекулярные механизмы взаимодействия остеогенеза и ангиогенеза: объяснение в тексте. ММСК (мультипотентные мезенхимные стромальные клетки), FGF (фактор роста фибробластов), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), PDGF (тромбоцитарный фактор роста), BMP (костные морфогенетические белки), TGF (трансформирующий фактор роста), OPN (остеопонтин), OCN (остеокальцин), ON (остеонектин), Bsp (костный сиалопротеин), OPG (остеопротегерин), PPAR (рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами), HIF (фактор, индуцируемый гипоксией), Runx (фактор транскрипции, связанный с Runt).

**Fig. 1.** Molecular mechanisms of interaction between osteogenesis and angiogenesis: explanation in the text. MMCK (multipotent mesenchymal stromal cells), FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), BMP (bone morphogenetic proteins), TGF (transforming growth factor), OPN (osteopontin), OCN (osteocalcin), ON (osteonectin), Bsp (bone sialoprotein), OPG (osteoprotegerin), PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), HIF (hypoxia-inducible factor), Runx (Runt-related transcription factor).

лирование васкуляризации были основаны на использовании различных проангиогенных цитокинов и факторов роста. VEGF, FGF, ангиопоэтин (Ang), TGF, PDGF и некоторые интерлейкины являются ключевыми факторами, стимулирующими васкуляризацию [29]. Добавление экзогенного PDGF способствует остеогенной дифференцировке стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ), а также формированию сосудистой сети *in vitro* за счет привлечения периваскулярных клеток [30]. Однако эффективная васкуляризация зависит не только от правильного сочетания факторов роста, но и от их дозированного и контролируемого высвобождения. Однократное введение факторов в высокой концентрации приводит к появлению функционально несовершенных кровеносных сосудов. Например, высокая концентрация VEGF приводит к формированию излишне проницаемых сосудов [29]. Поэтому преимущественно обладают системы, в которых факторы роста смешивают с гидрогелями или наносят на различные каркасы перед трансплантацией, что обеспечивает их дозированное высвобождение в течение долго периода. Например, для постепенного высвобождения VEGF могут быть использованы коллагеновые каркасы с частицами гидроксиапатита [31] или микрочастицы альгината, которые перед трансплантацией в область дефекта вводят в состав каркаса из коллагена и гидроксиапатита [32]. Такой подход позволяет также создавать системы, которые дозированно выделяют сразу несколько факторов в разных концентрациях. Например, использование каркаса на основе фосфата кальция и полилактогликолевой кислоты, который выделял одновременно PDGF и VEGF, приводило к формированию стабильной сосудистой сети [33]. В другом исследовании были получены пористые матрицы из бета-трикальцийфосфата ( $\beta$ -ТСП), которые контролируемо выделяли VEGF и BMP-2. Внутримышечная имплантация таких конструкций усиливала васкуляризацию и остеогенную дифференцировку [34]. Аналогичные результаты были показаны для BMP-2, VEGF и  $\beta$ FGF на модели дефекта свода черепа у крыс [35].

ММСК секретируют большинство из этих факторов, что во многом обеспечивает их регенеративные свойства. Показано, что кондиционированные среды от СКЖТ содержат VEGF, FGF-2 и ангиопоэтин, при этом пик концентрации приходится на 7-е сутки культивирования ММСК [36]. Также для СКЖТ показано присутствие IGF [37] и TGF $\beta$  [38]. Эти факторы могут способствовать регенерации костной ткани за счет единовременной стимуляции как васкуляризации, так и дифференцировки остеогенных предшественников. Эффективность использования кондиционирован-

ных сред от ММСК для терапии заболеваний костной ткани уже неоднократно была продемонстрирована на различных моделях *in vivo*. Показано, что кондиционированные среды от ММСК КМ значительно снижают область дефекта свода черепа у крыс, действуя как на остеогенез, так и на васкуляризацию [39]. Использование искусственных полимерных микрочастиц, заполненных концентрированной кондиционированной средой от ММСК КМ, снижает клеточный апоптоз, системное воспаление и увеличивает жизнеспособность остеобластов в мышечной модели остеопороза, вызванного овариэктомией [40]. Было проведено несколько клинических испытаний, подтверждающих безопасность и эффективность использования кондиционированных сред от ММСК в стоматологической практике для регенерации альвеолярной кости челюсти [41].

Генетическая инженерия открыла новые возможности доставки проангиогенных факторов. Одним из подходов является заселение твердых каркасов и гидрогелей остеогенными предшественниками (osteoblastами или ММСК), сверхэкспрессирующими гены ангиогенных факторов роста. Разнообразие методов генетической модификации позволяет получать необходимую концентрацию и скорость выделения каждого фактора. На модели дефекта свода черепа была показана эффективность СКЖТ, сверхэкспрессирующих BMP-2 и VEGF. Авторы смешивали BMP-2 и VEGF-трансфицированные клетки в разных концентрациях, подбирая оптимальное соотношение для стимуляции ангиогенеза и остеогенеза [42]. Также была показана эффективность ММСК костного мозга, сверхэкспрессирующих FGF, после трансплантации в дефект свода черепа у крыс [43]. Однако, несмотря на свою эффективность, основным недостатком метода генетической инженерии является его высокая стоимость.

МикроРНК — малые некодирующие молекулы РНК длиной около 22 нуклеотидов, регулирующие экспрессию генов за счет РНК интерференции. На основании экспериментальных данных было выделено множество микроРНК, которые отвечают за регуляцию взаимодействия процессов остеогенеза и ангиогенеза. К ним относятся miR-9, miR-10a, miR-20a, miR-26a, miR-29b, miR-31, miR-34a, miR-92a, miR-125b, miR-126, miR-135b, miR-181a, miR-195, miR-200b, miR-210, miR-222 и miR-424 и многие другие [44]. Экзогенное введение или ингибирование определенных микроРНК открывает широкий спектр терапевтических возможностей. Так, на *in vivo* модели остеопороза, индуцированного овариэктомией, было показано, что блокирование miR-

148a ингибирует резорбцию кости и увеличивает костную массу у мышей [38]. Аналогичные результаты были продемонстрированы при ингибировании miR-1187 [45]. Напротив, экзогенное введение miR-451 способствует дифференцировке и минерализации остеобластов на модели остеопороза, индуцированного овариэктомией [46]. Список микроРНК, регулирующих гомеостаз костной ткани, постоянно пополняется.

*Совместное культивирование остеогенных и ангиогенных клеток.* Другим подходом к достижению васкуляризации одновременно с остеогенезом в составе костных биоэквивалентов является совместное культивирование (со-культивирование) эндотелиальных и остеогенных клеток или их предшественников в монослое, сфероиде, гидрогеле или на различных каркасах. В качестве остеогенных клеток могут быть использованы как зрелые остеобласты, так и ММСК. Преимущество зрелых остеобластов заключается в том, что они сразу после трансплантации могут продуцировать минерализованный костный матрикс. Однако их сложно изолировать из тканей пациента и они медленно пролиферируют [29]. Поэтому при инженерии костной ткани отдается предпочтение остеопрогениторным клеткам, например ММСК, либо преостеобластным культурам. По сравнению со зрелыми остеобластами эти клетки имеют преимущества, так как могут быть легко изолированы из множества источников, имеют высокий пролиферативный потенциал, а также секретируют VEGF, стимулирующий ангиогенез и дифференцировку предшественников эндотелиальных клеток [47].

Эндотелиальные клетки являются более гетерогенной популяцией, чем остеобласты. Они различаются по морфологии, проницаемости и профилю экспрессии генов в зависимости от органа и типа сосудов. Из-за доступности источника, простоты выделения и культивирования чаще всего используются эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES). Также могут быть использованы предшественники эндотелиальных клеток (ПЭК). Они имеют высокий пролиферативный потенциал, жизнеспособность и успешно изолируются из периферической крови, костного мозга и пуповинной крови по экспрессии таких маркеров, как фактор фон Виллебранда (vWF), CD31, VE-кадгерин (белок клеточной адгезии эндотелия сосудов), CD133, Flk1 и CD34 [48]. В некоторых исследованиях используют и зрелые эндотелиальные клетки сосудов [14].

Преимущества со-культивирования эндотелиальных и остеогенных клеток было показано во многих исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Контактное взаимодей-

ствие между HUVES и остеобластами приводит к значительным изменениям экспрессии генов в обеих популяциях клеток с активацией Flk-1 в ЭК и щелочной фосфатазы в остеобластах [49]. ММСК положительно влияют на способность HUVES формировать стабильные капиллярные сети [50]. Однако после предварительной дифференцировки в остеогенном направлении ММСК теряют способность координировать ЭК и стимулировать формирование сосудов [26]. Совместная монослойная культура эндотелиальных клеток аорты и ММСК из костного мозга индуцирует как остеогенез, так и ангиогенез. Об этом свидетельствует образование капилляроподобных структур, интенсивная минерализация и увеличение экспрессии остеогенных маркеров [51]. При совместном культивировании ПЭК и ММСК КМ возрастает способность формировать капилляроподобные структуры, происходит более ранняя экспрессия остеогенных (Col1, OCN и BMP-2) и ангиогенных (VEGF, Flk1) маркеров [52], а также возрастает активность щелочной фосфатазы и отложение ВКМ, что вероятно связано с активацией MAPK-сигнального пути [53].

3D со-культивирование клеток в виде сфероидов приводит к усилению взаимодействия между двумя популяциями за счет высокого содержания ВКМ и формирования контактов. Так, совместное 3D культивирование ММСК КМ и HUVES значительно ускоряет остеогенную дифференцировку за счет активации Wnt и BMP-сигнальных путей [54]. Со-культивирование в сфероидах ЭК микрососудов кожи человека и остеобластов приводит к формированию капилляроподобных структур, которые после имплантации *in vivo* вырастают за пределы сфероидов и интегрируются в сеть окружающих кровеносных сосудов [55].

При совместном культивировании важную роль играет соотношение разных типов клеток. Соотношение HUVES и остеобластов в монослойной культуре 5:1 положительно влияет на ангиогенез, в то время как соотношение 1:5 способствует минерализации [56]. Для поддержания пролиферации эндотелиальных клеток аорты и ММСК КМ в совместной культуре баланс должен быть сдвинут в сторону первых (5:1, соответственно). В ином случае остеогенные клетки будут подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток [51]. Такая же закономерность показана для сфероидов из СКЖТ и HUVES: ангиогенный потенциал последних сохраняется при соотношении равном 2:8, соответственно [26].

Другим важным фактором, определяющим успех со-культивирования, является состав питательной среды и последовательность добавления различных ин-



дукционных факторов. Во многих исследованиях показано, что остеогенная среда оказывает ингибирующее действие на ЭК [50]. Вероятно, это может быть связано с содержащимся в среде  $\beta$ -глицерофосфатом, который индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток [57]. При культивировании СКЖТ в виде сфероидов для формирования полноценной сосудистой сети необходимо индуцировать сначала ангиогенез, а через 7 суток добавлять остеогенные индукционные факторы [30]. При со-культивировании HUVEC с ММСК костного мозга на децеллюляризованных костных каркасах развитие сосудов так же усиливается, если индуцировать ангиогенез до остеогенеза, а также добавлять новые ММСК из костного мозга на стадии остеогенной индукции [50]. Кроме того, было показано, что добавление в среду BMP-2 значительно снижает количество клеточного дебриса, что свидетельствует о том, что данный фактор может поддерживать жизнеспособность клеток [50]. Таким образом, последовательная индукция васкуляризации и остеогенеза способствует оптимальной дифференцировке клеток в пределах одной тканеинженерной конструкции.

Со-культивирование эндотелиальных и остеогенных прогениторных клеток является перспективным методом получения васкуляризованных костных биоэквивалентов. Однако использование клеток из разных источников ограничивает их клиническое применение, особенно в случае аутологичной терапии, при которой используются собственные клетки пациента, а не аллогенный материал. В связи с этим особое внимание уделяется поиску клеток, которые могут быть легко изолированы из тканей пациента, а также способны дифференцироваться и в ангиогенном, и в остеогенном направлении [58]. Данным критериям удовлетворяет популяция СКЖТ. Показано, что СКЖТ в высокой плотности в условиях как монослойного, так и 3D культивирования способны к самоорганизации и формированию тубулоподобных структур [14]. Единовременное добавление остеогенных и ангиогенных индукторов также может увеличить ангиогенный потенциал СКЖТ сфероида, что подтверждается формированием сосудоподобных структур в фибриновом геле [59]. Трансплантация различных пористых скаффолдов, заселенных сфероидом СКЖТ, приводит к формированию костной ткани, а также способствует васкуляризации тканеинженерной конструкции и ее интеграции в сосудистую сеть хозяина [60]. Культивирование СКЖТ на каркасах в присутствии остеогенных и ангиогенных индукционных факторов усиливает их остеогенную дифференцировку [61]. Таким образом, СКЖТ являются удобным типом клеток для воспро-

изведения *in vitro* ангиогенной ниши с целью регенерации сосудов и васкуляризации [62], а также способны дифференцироваться в остеогенном направлении, способствуя восстановлению костных дефектов. Однако ангиогенный потенциал СКЖТ в значительной степени зависит от стадии их дифференцировки [63] и предварительная индукция клеток в остеогенном направлении значительно снижает их способность к васкуляризации *in vivo* [55].

При со-культивировании клеток важную роль играет внеклеточный матрикс (ВКМ), содержание которого значительно увеличивается при культивировании на пористых каркасах или в 3D условиях по сравнению с монослойной культурой. ВКМ содержит факторы роста, которые в результате протеолиза матриксными металлопротеиназами могут участвовать в регуляции различных процессов. Так, было показано, что ВКМ, синтезируемый фибробластами, хондроцитами и ЭК, индуцирует остеогенез, а остеобластами – образование капилляров [29]. Это позволяет использовать в тканевой инженерии только синтезированный *in vitro* ВКМ вместо самих клеток.

*Костные синтетические биоматериалы.* При больших дефектах костной ткани инъекция суспензии клеток в область повреждения не эффективна, потому для доставки и закрепления клеток или сфероидов в области повреждения широкое применение находят различные синтетические биоматериалы. Функциональная костная ткань состоит из 3 основных компонентов: жесткого пористого минерализованного каркаса, клеток остеогенного ряда и кровеносных сосудов. *In vitro* такую систему можно создать, комбинируя синтетические биоматериалы с клетками, способными дифференцироваться в остеогенном и эндотелиальном направлениях, а также добавляя различные факторы роста, стимулирующие остеогенез и васкуляризацию. Идеальный каркас должен быть изготовлен из биоматериалов, имитирующих структуру и свойства естественного внеклеточного матрикса кости. Он должен способствовать адгезии клеток, обладать остеоиндуктивными свойствами, быть прочным, пористым для обеспечения васкуляризации и необходимой диффузии газов и питательных веществ, а также быть биосовместимым, то есть не вызывать отторжения при трансплантации [30].

На данный момент существует огромное разнообразие синтетических костных биоматериалов, многие из которых уже применяются в клинической практике. В большинстве современных исследований используют матрицы, основанные на соединениях кальция и фосфора, как например бета-трикальцийфосфат ( $\beta$ -ТСР)

и гидроксиапатит (НА) [7]. Основным преимуществом таких биоматериалов является их биodeградация после трансплантации, в результате чего освобождается пространство для пролиферации клеток, роста и васкуляризации кости, а также выделяются ионы Са и Р, которые могут дополнительно стимулировать остеогенез [16]. Для обеспечения одновременной васкуляризации и остеогенеза, каркасы часто заселяют совместной культурой из эндотелиальных и остеогениторных клеток, что приводит к более эффективному восстановлению поврежденной ткани [5].  $\beta$ -ТСР каркасы могут стимулировать остеогенную дифференцировку, а также поддерживать васкуляризацию конструкта. Показано, что HUVEC эффективнее пролиферируют и формируют сосудистую сеть на  $\beta$ -ТСР матрицах, по сравнению с другими каркасами [64]. В клинической практике  $\beta$ -ТСР уже не раз применялся для улучшения регенерации костной ткани. Культивирование СКЖТ на  $\beta$ -ТСР при добавлении BMP-2 фактора приводит к формированию конструкции, которая способна полностью восстановить крупный дефект бедренной кости [15]. Аналогичные результаты *in vivo* были получены при совместном культивировании ММСК с ПЭК на каркасе из  $\beta$ -ТСР [65]. Помимо Са-Р матриц используется также керамика на основе кремния, как например волластонит ( $\text{CaSiO}_3$ ), диопсид ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ) и другие. Кремний играет важную роль в кальцификации костей и предотвращает остеопороз, увеличивая синтез основных компонентов внеклеточного матрикса кости — коллагена и протеогликана [66]. Также применяют природные биоразлагаемые полимеры такие как коллаген, хитозан и целлюлоза. Их основное преимущество заключается в нетоксичности и низком риске иммунного ответа, так как основной продукт деградации этих полимеров — это аминокислоты, которые легко поглощаются организмом человека [66]. Данные полимеры могут быть использованы для контролируемой доставки факторов. Коллагеновые носители также способствуют миграции клеток и улучшают васкуляризацию после трансплантации [67]. По сравнению с природными полимерами, синтетические биоразлагаемые полимеры (полигликолевая кислота, поливиниловый спирт, поликапролактое и др.) сильно отличаются друг от друга по механическим и химическим свойствам. Химическая модификация позволяет создавать полимеры с необходимыми свойствами, варьируя степень биodeградации, адгезивные свойства, прочность и др. В обзоре С. Гао и соавт. [66] рассмотрены основные костные биоматериалы, описываются их характеристики и области применения.

Использование костных биоматериалов является перспективным подходом в регенеративной медицине. Жесткий каркас в сочетании с остеогенными сигналами создает для клеток необходимое механическое напряжение, запускает остеогенную дифференцировку и синтез ВКМ, а пористая структура каркаса позволяет равномерно заселить клетками весь конструкт и формирует пространство для васкуляризации, что необходимо для обеспечения всех клеток питательными веществами и газами. Данный подход позволяет наиболее точно моделировать *in vitro* структуру костной ткани с необходимым микроокружением для дифференцировки. Трансплантация таких васкуляризованных костных биоэквивалентов в область повреждения обеспечивает быстрое и эффективное восстановление кости.

**Биопечать.** Еще одним способом получения васкуляризованных костных биоэквивалентов является трехмерная биопечать — метод объединения разных типов клеток, факторов роста и внеклеточного матрикса для создания искусственных многоклеточных тканей или органов [68]. Биопечать позволяет с высокой точностью и воспроизводимостью послойно напечатать ткань, соблюдая необходимую геометрию и пространственное распределение разных типов клеток, и воспроизвести структуру и функции нативной ткани [69]. Данная тема обширна и заслуживает отдельного обзора. Существуют различные методы биопечати кровеносных сосудов, которые включают струйную (капельную), экструзионную и лазерную печать [70]. При биопечати на основе экструзии клетки ресуспендируют в гидрогеле, состоящем из альгината, фибрина, полиэтиленгликоля (ПЭГ) или желатина, формируя таким образом биочернила. После экструзии биочернила подвергаются физической или химической модификации, что придает им необходимую прочность и позволяет гелю сохранять форму [70]. Полая структура сосуда может быть получена путем печати в вертикальных полых трубочках, вокруг твердого стержня или с использованием «жертвенных» чернил [70]. Благодаря особой химической структуре такие чернила могут быть удалены после печати с помощью температуры, механического воздействия или путем инкубации в среде для культивирования клеток, содержащей ферменты, растворяющие гидрогель. В результате остаются полые каналы, которые могут быть заселены эндотелиальными клетками. Классическими «жертвенными» биочернилами являются желатин, который плавится при инкубации напечатанной конструкции при 37 °С, либо альгинат и гиалуроновая кислота, которые могут быть удалены ферментативным расщеплением при ин-

кубации конструкций в культуральной среде, содержащей альгинатлиазу или гиалуронидазу [29].

Струйный метод биопечати позволяет более точно распределять разные типы клеток при печати благодаря использованию тонких акустических и электростатических технологий [70]. Лазерную биопечать чаще используют для создания каркасов, которые затем засевают клетками, либо для печати клеток на поверхности конструкта [70].

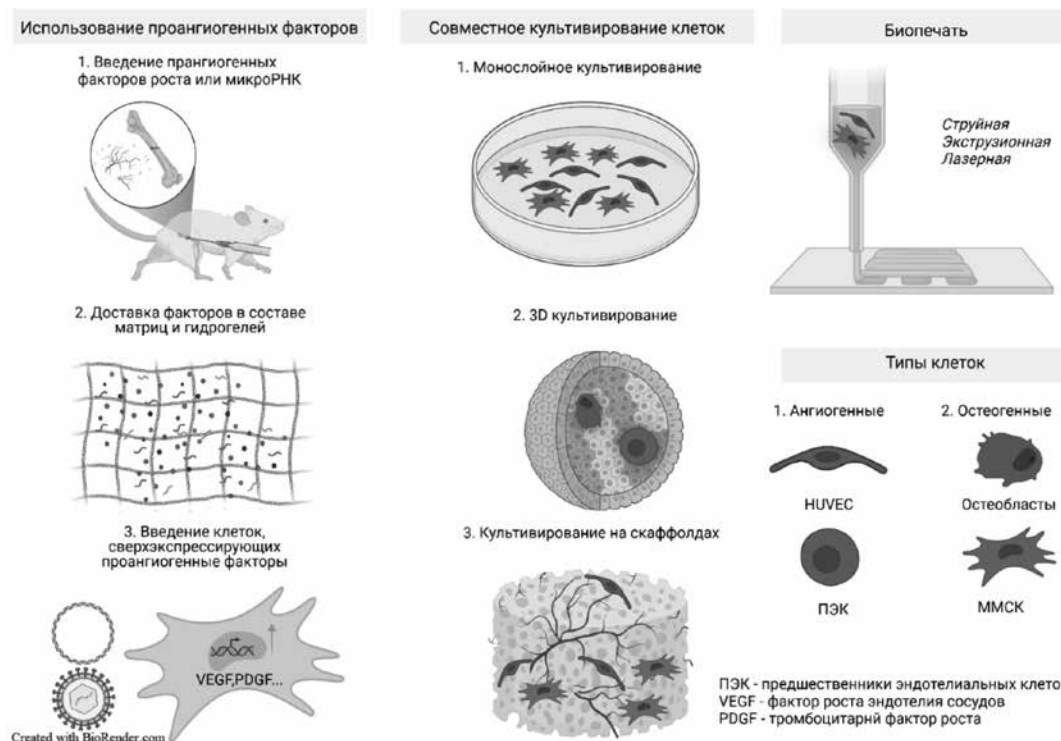
Комбинированная биопечать остеогенных и эндотелиальных предшественников представляет собой многообещающую стратегию для производства васкуляризированной искусственной костной ткани для восстановления костных дефектов критического размера. Так, в недавнем исследовании были созданы костные тканеинженерные конструкции путем биопечати СКЖТ и HUVES человека [71]. Подкожная имплантация таких конструкций мышам приводила к формированию из HUVES кровеносных сосудов, которые были окружены мышинными перицитами. При этом СКЖТ синтезировали кальцинированный костный матрикс [71]. В похожем исследовании методом экструзионной биопечати была напечатана конструкция, состоящая из ЭК микрососудов дермы человека и СКЖТ. Авторы показали, что имплантация данной конструкции способствовала формированию сосудистых структур и костного матрикса [12]. В другом исследовании наблюдали формирование сосудистой сети при совместной биопечати культур ПЭК и ММСК человека в коллагеновом гидрогеле [72]. Та же группа ученых использовала лазерную биопечать для печати HUVES непосредственно в костных дефектах свода черепа у мышей, заполненных ММСК и коллагеном с заякоренным на нем VEGF. HUVES были способны образовывать организованные микрососудистые сети на поверхности коллагена внутри костного дефекта, что приводило к увеличению скорости васкуляризации и регенерации кости уже через 2 месяца [72]. Для создания более сложной структуры сосуда можно использовать совместную культуру HUVES и перицитов [73]. В другом исследовании авторы пытались воссоздать структуру костного остеона с помощью экструзионной биопечати, используя ММСК и HUVES, инкапсулированные в фибриновые биочернила [74]. В недавнем исследовании была напечатана модель васкуляризированной кости с использованием желатин-наногидроксиапатитного каркаса. Каркас вначале засевали ММСК, которые подвергались остеогенной индукции, а спустя 2 недели добавляли HUVES для индукции ангиогенеза. Полноценная васкуляризация была достигнута уже через две недели [75].

Таким образом трехмерная биопечать демонстрирует высокий потенциал в экспериментах *in vivo* и *in vitro* и открывает новые возможности в тканевой инженерии. Однако, несмотря на достигнутый прогресс, это все еще новая технология, и на многие вопросы еще предстоит ответить.

Основные стратегии васкуляризации костного биоэквивалента кратко представлены на **рисунке 2**.

### Заключение

Современные подходы к созданию тканеинженерных конструкций для восстановления крупных дефектов костной ткани направлены на моделирование *in vitro* ниши, способствующей дифференцировке как клеток костной линии, так и клеток эндотелиального ряда для обеспечения должной васкуляризации. В эмбриональном развитии остеогенез и ангиогенез являются тесно связанными процессами, и взаимодействие между эндотелиальными клетками или их предшественниками с остеопрогениторными клетками имеет решающее значение для формирования костной ткани. В настоящее время существует много способов васкуляризации костной ткани. Разрабатываются новые методы доставки микроРНК и факторов роста, стимулирующих васкуляризацию. Изучается возможность со-культивирования остеогенных и эндотелиальных клеток и их предшественников в виде сфероидов, в составе гидрогеля, а также на синтетических каркасах. Разрабатываются подходы единовременной индукции ММСК в остеогенном и ангиогенном направлении. В последнее время многие ученые отдают предпочтение трехмерной биопечати, так как она позволяет быстро получить сложноорганизованные конструкции из остеопрогениторных клеток, окруженных полыми сосудами, состоящими из эндотелиальных и периваскулярных клеток, а также сделать эти конструкции персонализированными с учетом особенностей дефекта у конкретного пациента. Однако многие вопросы остаются не до конца неизученными: оптимальные составы биоматериалов для контролируемой доставки факторов роста, оптимальное соотношение остеогенных и эндотелиальных предшественников при совместном культивировании, последовательность и продолжительность добавления, а также концентрации индукционных факторов для обеспечения успешной васкуляризации при сохранении остеогенной составляющей. Метод биопечати влечет за собой множество вопросов, связанных с типом используемого гидрогеля, концентрацией клеток и составом факторов роста. Будущие исследования должны быть направлены на выяснение механизмов взаимодействия между эн-



**Рис. 2.** Стратегии васкуляризации костного биоэквивалента: объяснение в тексте. MMCK (мультипотентные мезенхимные стромальные клетки), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), PDGF (тромбоцитарный фактор роста), ПЭК (предшественники эндотелиальных клеток), HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека).

**Fig. 2.** Bone bioequivalents vascularization strategies: explanation in the text. MMCK (multipotent mesenchymal stromal cells), VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), ПЭК (endothelial precursor cells), HUVEC (human umbilical vein endothelial cells).

дотелиальными и остеогенными предшественниками в разных системах, а также на обеспечение оптимизированных и стандартизированных условий культивирования. Подбор оптимального источника клеток и систем культивирования может приблизить нас к клиническому применению костных тканеинженерных конструкций для восстановления крупных дефектов.

**Литература/References**

1. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet. Heal. Longev.* 2021; 2: 580–92. [https://doi.org/10.1016/S2666-7568\(21\)00172-0](https://doi.org/10.1016/S2666-7568(21)00172-0)
2. Wang W., Yeung K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* 2017; 2: 224–47. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
3. Baldwin P., Li D. J., Auston D.A., Mir H.S., Yoon R.S., Koval K.J. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J. Orthop. Trauma.* 2019; 33: 203–13. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001420>
4. Cancedda R., Giannoni P., Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical prac-

tice. *Biomaterials.* 2007; 28, 4240–50. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.023>

5. Genova T., Roato I., Carossa M., Motta C., Cavagnetto D., Mussano F. Advances on Bone Substitutes through 3D Bioprinting. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(19): 7012. <https://doi.org/10.3390/ijms21197012>
6. Muschler G.F., Nakamoto C., Griffith L.G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Jt. Surg Am.* 2004; 86: 1541–58. <https://doi.org/10.2106/00004623-200407000-00029>
7. Clarkin C., Olsen B.R. On bone-forming cells and blood vessels in bone development. *Cell Metab.* 2010; 12: 314–16. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.09.009>
8. Long F., and Ornitz D. M. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013; 5: 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008334>
9. Rutkovskiy. (2016). Osteoblast Differentiation at a Glance. 95–106. <https://doi.org/10.12659/msmbr.901142>
10. Salazar V.S., Gamer L.W., Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016; 12: 203–21. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.12>
11. Li Y., Ge C., Long J.P., Begun D.L., Rodriguez J.A., Goldstein S.A., et al. Biomechanical stimulation of osteoblast gene expression requires phosphorylation of the RUNX2 transcription factor. *J. Bone Miner. Res.* 2012; 27: 1263–74. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1574>

12. Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., et al. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*. 2002; 108: 17–29. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00622-5)
13. Armulik A., Abramsson A., and Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 2005; 97: 512–23. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>
14. Kocherova I., Bryja A., Mozdziak P., Angelova Volponi A., Dyszkiewicz-Konwińska M., Piotrowska-Kempisty H., et al. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *J. Clin. Med.* 2019; 8(10): 1602. <https://doi.org/10.3390/jcm8101602>
15. Olsson A., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-welsh L. Reviews VEGF receptor signalling — in control of vascular function. 2006; 7: 359–71.
16. Ho-Shui-Ling A., Bolander J., Rustom L.E., Johnson A.W., Luyten F.P., Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018; 180: 143–62. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>
17. Hu K., Olsen B. R., Hu K., Olsen B. R. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest*. 2016; 126: 509–26. <https://doi.org/10.1172/JCI82585>
18. Street J., Bao M., Bunting S., Jr F., Ferrara N., Steinmetz H., et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99(15): 9656–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.152324099>
19. Mallela J., Ravi S., F. Jean Louis, Mulaney B., Cheung M., U. Sree Garapati, et al. Natriuretic peptide receptor A signaling regulates stem cell recruitment and angiogenesis: a model to study linkage between inflammation and tumorigenesis. *Stem Cells*. 2013; 31(7): 1321–7. <https://doi.org/10.1002/sterm.1376>
20. Wan C., Shao J., Gilbert S.R., Riddle R.C., Long F., Johnson R.S., et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in skeletal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010; 1192: 322–26. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05238.x>
21. Lambertin E., Penolazzi L., Angelozzi M., Bergamin L.S., Manfredini C., Vieceli Dalla Sega F., et al. Hypoxia Preconditioning of Human MSCs: a Direct Evidence of HIF-1 $\alpha$  and Collagen Type XV Correlation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2018; 51: 2237–49. <https://doi.org/10.1159/000495869>
22. Bai Y., Yin G., Huang Z., Liao X., Chen X., Yao Y., et al. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering. *Int. Immunopharmacol.* 2013; 16: 214–23. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.04.001>
23. Chen G., Deng C., Li Y.P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8: 272–88. [10.1016/j.ijbs.2929](https://doi.org/10.1016/j.ijbs.2929)
24. Protein M., Peng H., Ph D., Huard J., Ph D. The Dose of Growth Factors Influences the Synergistic Effect of Vascular Endothelial Growth Factor Ectopic Bone Formation. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(8): 2123–33. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0214>
25. Caplan A.I., Correa D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 2011; 29 (12): 1795–803. <https://doi.org/10.1002/jor.21462>
26. Marshall J., Barnes A., Genever P. Analysis of the Intrinsic Self-Organising Properties of Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Co-Culture Models with Endothelial Cells. *Bioengineering*. 2018; 5: 92. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5040092>
27. Schlund C., El Khassawna T., Serra A., Dienelt A., Wendle S., Schell H., et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone*. 2018; 106: 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.10.019>
28. Manieri N.A., Mack M.R., Himmelrich M.D., Worthley D.L., Hanso E.M., Eckmann, L., et al. Mucosally transplanted mesenchymal stem cells stimulate intestinal healing by promoting angiogenesis. *J. Clin. Invest*. 2015; 125: 3606–18. <https://doi.org/10.1172/JCI81423>
29. Simunovic F., Finkenzeller G. Vascularization strategies in bone tissue engineering. *Cells*. 2021; 10(7): 1749. <https://doi.org/10.3390/cells10071749>
30. Hutton D.L., Moore E.M., Gimble J.M., Grayson W.L. Platelet-derived growth factor and spatiotemporal cues induce development of vascularized bone tissue by adipose-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A*. 2013; 19: 2076–86. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0752>
31. Piard C., Luthcke R., Kamalidinov T., Fisher J. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor from mesoporous calcium-deficient hydroxyapatite microparticles promotes in vitro angiogenesis and osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2021; 109: 1080–87. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37100>
32. Quinlan, E., López-Noriega, A., Thompson, E.M., Hibbitts, A., Cryan, S.A., & O'Brien, F.J. Controlled release of vascular endothelial growth factor from spray-dried alginate microparticles in collagen-hydroxyapatite scaffolds for promoting vascularization and bone repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2017; 11(4), 1097–109. <https://doi.org/10.1002/term.2013>
33. Farokhi M., Mottaghtalab F., Ai J., Shokrgozar M.A. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *Int. J. Pharm.* 2013; 454: 216–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.080>
34. Suárez-González D., Lee J.S., Diggs A., Lu Y., Nemke B., Markel M., et al. Controlled multiple growth factor delivery from bone tissue engineering scaffolds via designed affinity. *Tissue Eng. Part A*. 2014; 20: 2077–87. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0358>
35. Kuttappan S., Mathew D., Jo J.I., Tanaka R., Menon D., Ishimoto T., et al. Dual release of growth factor from nanocomposite fibrous scaffold promotes vascularisation and bone regeneration in rat critical sized calvarial defect. *Acta Biomater*. 2018; 78: 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.050>
36. Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Kalinina N., Akopyan Z., et al. Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(7): 1656. [10.3390/ijms20071656](https://doi.org/10.3390/ijms20071656)
37. Sadat S., Gehmert S., Song Y.-H., Yen Y., Ba X., Gaiser S., et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 363: 674–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.058>
38. Cheng P., Chen C., He H.B., Hu R., Zhou H.D., Xie H., et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2013; 28: 1180. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1845>
39. Osugi M., Katagiri W., Yoshimi R., Inukai T., Hib H., Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng. Part A*. 2012; 18: 1479–89. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0325>

40. Shen M., Wu R., Jin R., Pan J., Guo F., Li Z., et al. Injection of synthetic mesenchymal stem cell mitigates osteoporosis in rats after ovariectomy. *J. Cell. Mol. Med.* 2018; 22: 3751–57. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13618>
41. Katagiri W., Osugi M., Kawai T., Hibi H. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head Face Med.* 2016; 12: 5. <https://doi.org/10.1186/s13005-016-0101-5>
42. Lee E., Ko J.-Y., Kim J., Park J.-W., Lee S., Im G.-I. Osteogenesis and angiogenesis are simultaneously enhanced in BMP2-/VEGF-transfected adipose stem cells through activation of the YAP/TAZ signaling pathway. *Biomater. Sci.* 2019; 7: 4588–602. <https://doi.org/10.1039/c9bm01037h>
43. Qu D., Li J., L. Y., Gao Y., Zuo Y., Hsu Y., et al. Angiogenesis and osteogenesis enhanced by bFGF ex vivo gene therapy for bone tissue engineering in reconstruction of calvarial defects. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2011; 96: 543–51. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33009>
44. Fröhlich L.F. Micrnas at the Interface between Osteogenesis and Angiogenesis as Targets for Bone Regeneration. *Cells.* 2019; 8(2): 121. <https://doi.org/10.3390/cells8020121>
45. John A.A., Prakash R., Kureel J., Singh D. Identification of novel microRNA inhibiting actin cytoskeletal rearrangement thereby suppressing osteoblast differentiation. *J. Mol. Med. (Berl).* 2018; 96: 427–44. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1624-y>
46. Karvande A., Kushwaha P., Ahmad N., Adhikary S., Kothari P., Tripathi A. K., et al. Glucose dependent miR-451a expression contributes to parathyroid hormone mediated osteoblast differentiation. *Bone.* 2018; 117: 98–115. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.09.007>
47. Ge Q., Zhang H., Hou J., Wan L., Cheng W., Wang X., et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms. *Mol. Med. Rep.* 2018; 17: 1667–75. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8059>
48. Kim S., Recum H. Endothelial Stem Cells and Precursors for Tissue Engineering : Cell Source, Differentiation, Selection, and Application. *Tissue Eng Part B.* 2008; 14(1): 133-47. <https://doi.org/10.1089/teb.2007.0304>
49. Stahl A., Wenger A., Weber H., Stark G.B., Augustin H.G., Finkenzeller G. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 322: 684–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.175>
50. Correia C., Grayson W.L., Park M., Hutton D., Zhou B., Guo X.E., et al. In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. *PLoS One.* 2011; 6: 28352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028352>
51. Gurel Pekozer G., Torun Kose G., Hasirci V. Influence of co-culture on osteogenesis and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and aortic endothelial cells. *Microvasc. Res.* 2016; 108: 1–9. [10.1016/j.mvr.2016.06.005](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.06.005)
52. Li Q., Wang Z. Influence of Mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in co-culture on osteogenesis and angiogenesis: An in vitro study. *Arch. Med. Res.* 2013; 44: 504–13. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.06.005>
53. Xu C., Liu H., He Y., Li Y., and He X. Endothelial progenitor cells promote osteogenic differentiation in co-cultured with mesenchymal stem cells via the MAPK-dependent pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 2020a; 11: 537. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02056-0>
54. Saleh F.A., Whyte M., Genever P.G. Effects of Endothelial Cells on Human Mesenchymal Stem Cell Activity in a 3D In Vitro Model. 2011; 44: 242–57. <https://doi.org/10.22203/ecm.v022a19>
55. Walser R., Metzger W., Görg A., Pohlemann T., Menger M.D., Laschke M.W. Generation of co-culture spheroids as vascularisation units for bone tissue engineering. 2013; 26: 222–33. <https://doi.org/10.22203/ecm.v026a16>
56. Shah A.R., Wenke J.C., Agrawal C.M. Manipulation of Human Primary Endothelial Cell and Osteoblast Coculture Ratios to Augment Vasculogenesis and Mineralization. *Ann. Plast. Surg.* 2016; 77: 122–28. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000318>
57. Di Marco G.S., Hausberg M., Hillebrand U., Rustemeyer P., Witkowski W., Lang D., et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008; 294: 1381–87. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00003.2008>
58. Saburina I.N., Gorkun A.A., Fidarov A.F., Kolokol'tsova T.D., Zurina I.M., Kosheleva N.V., et al. Induction of Vascular- and Osteogenesis in Spheroids Formed by Adipose-Derived Stromal Cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; 166: 163–69. [10.1007/s10517-018-4306-4](https://doi.org/10.1007/s10517-018-4306-4)
59. Gorkun A.A., Revokatova D.P., Zurina I.M., Nikishin D.A., Bikmulina P.Y., Timashev P.S., et al. The Duo of Osteogenic and Angiogenic Differentiation in ADSC-Derived Spheroids. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9: 572727. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.572727>
60. Laschke M.W., Menger M.D. Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnol. Adv.* 2016; 34: 112–21. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.004>
61. Gardin C., Bressan E., Ferroni L., Nalesso E., Vindigni V., Stellini E., et al. In vitro concurrent endothelial and osteogenic commitment of adipose-derived stem cells and their genomic analyses through comparative genomic hybridization array: novel strategies to increase the successful engraftment of tissue-engineered bone grafts. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 767–77. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0147>
62. Cerino G., Gaudiello E., Muraro M.G., Eckstein F., Martin I., Scherberich A., et al. Engineering of an angiogenic niche by perfusion culture of adipose-derived stromal vascular fraction cells. *Sci. Rep.* 2017; 7: 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13882-3>
63. Scherzed A., Hackenberg S., Froelich K., Rak K., Schendzielorz P., Gehrke T., et al. The differentiation of hMSCs counteracts their migration capability and pro - angiogenic effects in vitro. 2016; 35(1): 219–26. [10.3892/or.2015.4383](https://doi.org/10.3892/or.2015.4383)
64. Chen Y., Wang J., Zhu X.D., Tang Z.R., Yang X., Tan Y.F., et al. Enhanced effect of  $\beta$ -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence. *Acta Biomater.* 2015; 11: 435–48. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.028>
65. Seebach C., Henrich D., Kähling C., Wilhelm K., Tami A.E., Alini M., et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng. Part A.* 2010; 16: 1961–70. [10.1089/ten.TEA.2009.0715](https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0715)
66. Gao C., Peng S., Feng P., Shuai C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res.* 2017; 5: 17059. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.59>
67. O'Loughlin A., Kulkarni M., Crean M., Vaughan E.E., Mooney E., Shaw G., et al. Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. *Diabetes.* 2013; 62: 2588–94. <https://doi.org/10.2337/db12-1822>

68. Matai I., Kaur G., Seyedsalehi A., McClinton A., Laurencin C.T. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*. 2020; 226: 119536. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119536>
69. Murphy S.V., De Coppi P., Atala A. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. *Nat. Biomed. Eng.* 2020; 4: 370–80. [10.1038/s41551-019-0471-7](https://doi.org/10.1038/s41551-019-0471-7)
70. Chen E.P., Toksoy Z., Davis B.A., Geibel J.P. 3D Bioprinting of Vascularized Tissues for in vitro and in vivo Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021; 9: 664188. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.664188>
71. Rukavina P., Koch F., Wehrle M., Tröndle K., Björn Stark G., Koltay P., et al. In vivo evaluation of bioprinted prevascularized bone tissue. *Biotechnol. Bioeng.* 2020; 117: 3902–11. <https://doi.org/10.1002/bit.27527>
72. Kérourédan O., Hakobyan D., Rémy M., Ziane S., Dusserre N., Fricain J.-C., et al. In situ prevascularization designed by laser-assisted bioprinting: effect on bone regeneration. *Biofabrication*. 2019; 11: 45002. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab2620>
73. Xu L., Varkey M., Jorgensen A., Ju J., Jin Q., Park J. H., et al. Bioprinting small diameter blood vessel constructs with an endothelial and smooth muscle cell bilayer in a single step. *Biofabrication*. 2020b; 12: 45012. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aba2b6>
74. Piard C., Baker H., Kamalitinov T., Fisher J. Bioprinted osteon-like scaffolds enhance in vivo neovascularization. *Biofabrication*. 2019; 11: 25013. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab078a>
75. Chiesa I., De Maria C., Lapomarda A., Fortunato G.M., Montemurro F., Di Gesù R., et al. Endothelial cells support osteogenesis in an in vitro vascularized bone model developed by 3D bioprinting. *Biofabrication*. 2020; 12: 25013.

**Сведения об авторах:**

**Сабуринa Ирина Николаевна**, доктор биол. наук, зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития;

**Зурина Ирина Михайловна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития;

**Горкун Анастасия Алексеевна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития;

**Ревокатова Дарья Петровна**, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития.