

РОЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОСТЕОБЛАСТОВ И ОСТЕОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И В ХОДЕ ПРОЦЕССА ОСТЕОДИФФЕРЕНЦИРОВКИ *IN VITRO* В КЛЮЧЕ ДАЛЬНЕЙШИХ ПЕРСПЕКТИВ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Ковалева А. А., Краснова О. А., Неганова И. Э.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург,
Россия

Контактная информация:
Ковалева Анастасия Андреевна,
ФГБУН ИНЦ РАН,
Тихорецкий пр., д. 4, Санкт-Петербург,
Россия, 194064.
E-mail: lapislapis1999@gmail.com

Статья поступила в редакцию 14.10.2024
и принята к печати 01.12.2024

Резюме

Заболелания, ассоциированные с нарушением гомеостаза костной ткани, включая остеопороз, находятся среди патологий, которые лидируют по уровню летальности. Разработка и внедрение подходов тканевой инженерии, основанных на применении мезенхимных стволовых клеток, обещают стать высокоэффективным методом их терапии. Однако фундаментальные молекулярно-клеточные механизмы, нарушение которых приводит к развитию заболеваний костной ткани, требуют дополнительных исследований. Взаимодействия между остеобластами и остеоцитами костной ткани, несомненно, играют важную роль в поддержании баланса между процессами формирования кости и вовлечены в патогенез заболеваний костной ткани. Для более углубленного понимания различных аспектов этих взаимодействий необходима репрезентативная модель. Использование клеточных культур человека в качестве составной части такой модели более точно отображает физиологические нюансы, в отличие от клеточных культур, полученных из тканей модельных животных. Возможность создания систем совместного культивирования остеобластов и остеоцитов, полученных из мезенхимных стволовых клеток человека, и их применение в контексте трансляционной медицины находятся в фокусе внимания авторов настоящего обзора.

Ключевые слова: костная ткань, мезенхимные стволовые клетки, остеобласты, остеогенная дифференцировка, остеоциты

Для цитирования: Ковалева А.А., Краснова О.А., Неганова И.Э. Роль взаимодействия остеобластов и остеоцитов в условиях *in vivo* и в ходе процесса остеодифференцировки *in vitro* в ключе дальнейших перспектив применения для целей регенеративной медицины. Трансляционная медицина. 2024; 11(6): 532-545. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-6-532-545. EDN: TSJMCP

////////////////////////////////////

THE ROLE OF THE INTERACTION OF OSTEOBLASTS AND OSTEOCYTES *IN VIVO* AND DURING THE PROCESS OF OSTEODIFFERENTIATION *IN VITRO* IN THE KEY OF FURTHER PROSPECTS OF APPLICATION FOR THE PURPOSES OF REGENERATIVE MEDICINE

Anastasiia A. Kovaleva, Olga A. Krasnova, Irina E. Neganova

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Maria S. Kishenya,
Donetsk State Medical University named
after M. Gorky,
Ilyich ave., 16, Donetsk, Russia, 283003.
E-mail: maria.kishenya@gmail.com

Received 20 December 2023; accepted
15 February 2024

////////////////////////////////////

Abstract

Pathologies associated with impaired bone homeostasis, including osteoporosis, are among the leading diseases in terms of mortality. The development and implementation of tissue engineering approaches based on the use of human mesenchymal stem cells promises to become a highly effective method for their therapy. However, the fundamental cellular mechanism, which is associated with the development of bone diseases, require an additional study. Interactions between osteoblasts and osteocytes of bone tissue undoubtedly plays an important role in maintaining a balance between the processes of bone formation and resorption and involved in the pathogenesis of certain diseases. For more in-depth understanding of the various aspects of these interactions, a representative model is needed. In contrast to cell cultures obtained from the tissues of animal models, the employment of human mesenchymal stem cell cultures reflects more accurately the physiological and phenotypical nuances in human bone. The possibility of creating systems for the co-cultivation of osteoblasts and osteocytes derived from human mesenchymal stem cells and their application in the context of translational medicine is in the focus of this review.

Key words: bone tissue, mesenchymal stem cells, osteoblasts, osteocytes, osteogenic differentiation

For citation: Kovaleva AA, Krasnova OA, Neganova IE. The role of the interaction of osteoblasts and osteocytes in vivo and during the process of osteodifferentiation in vitro in the key of further prospects of application for the purposes of regenerative medicine. Translational Medicine. 2024; 11(6): 532-545. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-6-532-545. EDN: TSJMCP

Введение

В ходе ежедневных нагрузок, приходящихся в основном на скелетную систему, костная ткань подвергается микротравмам, что приводит к нарушениям ее целостности и микроархитектуры. Физиологический механизм, который лежит в основе поддержания гомеостаза костной ткани, — процесс ее ремоделирования [1]. Ремоделирование сочетает в себе скоординированное и взаиморегулируемое протекание двух противоположных

по смыслу процессов — остеорезорбции и остеогенеза. Остеорезорбция характеризуется остеокласт-опосредованной деградацией старой или поврежденной костной ткани. В то время как остеогенез представляет собой формирование остеобластами белкового фибриллярного компонента костного матрикса, состоящего преимущественно из минерализованного коллагена [2]. Превалирование процесса резорбции над процессом формирования кости является

основным механизмом развития остеопоротического поражения костной ткани (КТ) [3]. В контексте клеточных механизмов остеопороза наиболее часто исследователи фокусируются именно на системе взаимодействий остеобластов с остеокластами. Однако в последнее время внимание специалистов направлено и на изучение роли взаимодействий остеоцитов с остеобластами [4–9]. В настоящем обзоре мы рассматриваем основные стратегии получения остеобластов и остеоцитов человека в лабораторных условиях, основные молекулярно-клеточные механизмы, регулирующие дифференцировку этих клеток как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*, а также обсуждаем потенциал и возможности создания их совместных клеточных культур. В перспективе разработанные протоколы совместного культивирования остеобластов и остеоцитов позволят рассматривать их как модели для решения задач регенеративной медицины.

Анализируя взаимодействия остеобластов и остеоцитов в системе *in vitro*, можно исследовать клеточные механизмы, связанные с ремоделированием и поддержанием гомеостаза КТ. Изучение пациент-специфичных остеобластов и остеоцитов *in vitro* позволяет выявлять индивидуальные патогенетические механизмы, лежащие в основе остеопороза, а также проводить скрининг терапевтических агентов, корректирующих формирование кости [10]. Их тестирование на пациент-специфичных клеточных линиях может быть полезно

при назначении индивидуальных рекомендаций к дальнейшей терапии остеопороза.

Получение пациент-специфичных остеобластов и остеоцитов в лабораторных условиях позволит более точно смоделировать процессы, отражающие события формирования КТ, учитывая индивидуальные генетические особенности больных.

1. Процесс дифференцировки остеобластов в организме

Остеобласты являются основными клетками, участвующими в процессе формирования кости [11]. Минерализованный костный матрикс нарабатывается и поддерживается остеобластами, которые постоянно обмениваются сигнальными молекулами с другими основными участниками процесса (ре)моделирования: остеокластами и остеоцитами. Важнейшие сигнальные каскады этих взаимодействий освещены во многих статьях [3, 12–15]. В данном разделе мы рассмотрим основные сигнальные события в ходе остеобластогенеза.

Источником остеобластов КТ являются мезенхимные стволовые клетки (МСК) костного мозга [16]. Процесс остеогенной дифференцировки строго регулируется рядом транскрипционных факторов, внеклеточных сигнальных молекул и посттрансляционных модификаций белков-участников [11]. Мастер-регулятором дифференцировки МСК в остеобластном направлении является транскрипционный фактор RUNX2 (Runt-related transcription factor-2) [17]. В ходе экспериментов инактивиру-

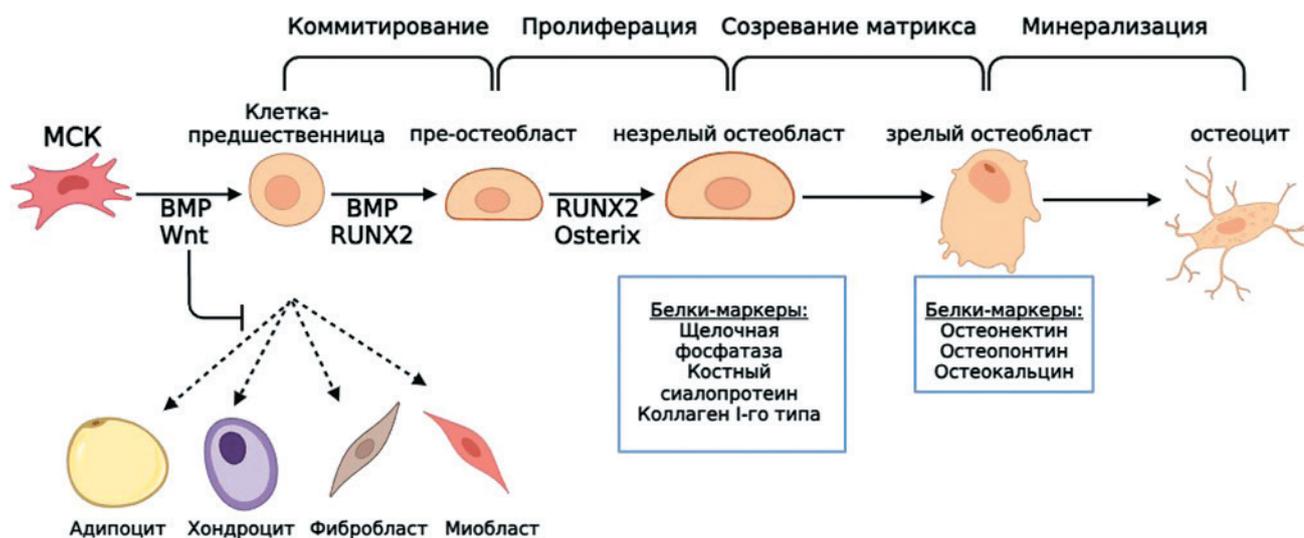


Рис. 1. Этапы остеогенной дифференцировки МСК и основные характерные маркеры

Figure 1. A stage-by-stage illustration of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells & main peculiar osteo-markers

ющая мутация в гене *RUNX2* приводила к отсутствию потенциала к остеогенной дифференцировке и неспособности к минерализации матрикса [16]. Еще одним транскрипционным фактором, вовлеченным в этап ранней дифференцировки остеобластов, является Osterix (Transcription Factor Sp7/Транскрипционный фактор Sp7) [16]. По аналогии с *RUNX2*, инактивация Osterix у мышей также приводила к нарушениям в процессе дифференцировки остеобластов и в формировании костного матрикса [11].

Результаты большого количества исследований показали, что на экспрессию *RUNX2* и Osterix способны влиять другие сигнальные пути, среди которых TGF- β /BMP сигнальный путь (BMP — Bone Morphogenic Protein/Морфогенный белок костной ткани), а также Wnt/ β -катениновый сигнальный путь [11].

На начальных этапах дифференцировки происходит коммитирование мезенхимных клеток-предшественниц в хондро/остеобластном направлении. Маркером этого раннего этапа является повышение экспрессии *RUNX2*, *DLX5* (Distal-Homeobox 5) и Osterix [18]. Далее такая коммитированная клетка становится пре-остеобластом, что сопровождается изменением морфологии с типичной для МСК на кубоидную с базально расположенным ядром и транскрипцией ранних генов остеогенной дифференцировки: щелочной фосфатазы (ALP) и $\alpha 1$ -цепи коллагена I типа (*COL1A1*) (рис. 1). Экспрессия этих генов будет поддерживаться на протяжении всего периода жизни зрелого остеобласта. По мере созревания будут транскрибироваться и другие маркеры зрелых остеобластов: остеопонтин, сиалопротеин кости I и II, а также остеокальцин [18, 19]. Как правило, высокий уровень их экспрессии соответствует состоянию зрелого остеобласта (рис.1), способного секретировать органический матрикс вокруг себя и подвергать его минерализации [18].

Терминальным этапом для остеобластов преимущественно является их последующая дифференцировка в остециты в условиях организма. В настоящем обзоре этому посвящен раздел 3. Получение остецитов в лабораторных условиях обсуждается в разделе 4 данного обзора.

2. Процесс дифференцировки остеобластов в условиях *in vitro*

В условиях *in vitro* мезенхимные стволовые клетки сохраняют свой остеогенный потенциал, что позволяет использовать полученные из них остеобласты в исследованиях. Существует ряд подходов к индукции остеодифференциров-

ки МСК в лабораторных условиях. Среди них — использование искусственно синтезированных структур внеклеточного матрикса, реактивных форм кислорода, различных физических стимулов (ультразвук, воздействие электромагнитным полем, теплом, лазерным излучением), цитоплазматических экстрактов остеобластов, а также использование подходов генной инженерии (табл. 1) [20]. Однако наиболее часто, по ряду объективных причин, применяется культивирование МСК в остеоиндуктивной среде.

Состав культуральной среды, используемый для индукции остеогенной дифференцировки МСК, стандартизирован и широко применяется в лабораторной практике. Остеоиндуктивная среда содержит три основных компонента, запускающих и поддерживающих остеогенную дифференцировку: аскорбиновую кислоту (аскорбат-2-фосфат), дексаметазон и β -глицерофосфат [30]. Протоколы остеогенной дифференцировки МСК в остеобласты в условиях *in vitro* предполагают добавление остеоиндуктивной среды к клеткам на протяжении 21 дня [31–34].

Наиболее важными для остеогенной дифференцировки индукторами в составе такой среды являются дексаметазон и аскорбат-2-фосфат. Дексаметазон, являясь глюкокортикоидом, запускает экспрессию гена *RUNX2* посредством активации Wnt/ β -катенинового сигнального пути. Исходно добавление дексаметазона активирует LIM-доменный белок FHL2 (Four-and-a-half LIM domains protein 2), который взаимодействует с β -катенином, что было показано методом ко-иммунопреципитации [31]. В свою очередь, аскорбат-2-фосфат служит кофактором в процессе синтеза коллагена, способствует пролиферации и выживанию дифференцирующихся клеток-предшественниц остеобластов [35, 36]. Бета-глицерофосфат является неорганическим источником, необходимым для формирования остеобластами кальций-фосфатных депозитов [37].

Основным препятствием для работы с МСК в условиях *in vitro* является ограниченное количество пассажей, после которых они неизбежно подвергаются феномену так называемого клеточного старения, что приводит к снижению их пролиферативного потенциала, изменениям в морфологии и профиле экспрессии маркеров. Так, в стареющих клетках наблюдается тенденция к снижению экспрессии генов, отвечающих преимущественно за остеогенную дифференцировку. Среди них — *RUNX2*, *ALP* (щелочная фосфатаза) и *BGLAP* (остеокальцин). Одновременно с этим повышается экспрессия *RANKL*, необходимого для протекания

Таблица 1. Способы дифференцировки МСК в остеобласты в условиях *in vitro*Table 1. MSCs differentiation into osteoblasts: *in vitro* approaches

Подход	Принцип	Преимущества	Недостатки	Источники
Использование искусственно синтезированных структур внеклеточного матрикса	Внеклеточный матрикс представляет собой сложную структуру, которая создает благоприятное микроокружение для запуска клеточной дифференцировки. На основе знаний о структуре внеклеточного матрикса костной ткани разрабатываются биоинженерные скаффолды, способствующие индукции остеогенной дифференцировки <i>in vitro</i> .	<p>Позволяют воспроизвести нативное микроокружение.</p> <p>Есть возможность «кастомизации» в соответствии с поставленными целями и задачами.</p> <p>Создание системы, в которой высвобождение активных веществ можно контролировать во времени и в пространстве.</p> <p>Могут быть адаптированы для нужд регенеративной медицины.</p>	<p>Трудоемкое производство.</p> <p>Низкая воспроизводимость ввиду гетерогенности.</p> <p>Сложности создания полимеров, полностью повторяющих компоненты внеклеточного матрикса, с чем связаны трудности в контроле физико-химических свойств скаффолдов.</p>	[21, 22]
Использование реактивных форм кислорода	Реактивные формы кислорода, выполняя роль вторичных мессенджеров, участвуют в регуляции различных сигнальных каскадов. В том числе, вовлеченных в остеогенную дифференцировку (сигнальный каскад ROS/HIF1 α).	Позволяет создать условия, приближенные к нативным (стадия раннего остеогенеза и заживления переломов).	Неоднозначная роль в поддержании гомеостаза костной ткани. Повреждающее воздействие на клетки, подавление пролиферации.	[23–25]
Физические стимулы	Внешние физические стимулы регулируют клеточную дифференцировку. Клетки костной ткани являются механосенсорными. При приложении физического стимула происходит активация сигнальных каскадов, ассоциированных с Wnt/ β -catenin, коннексином 43.	Усиливают остеогенный эффект конвенциональных методов остеогенной дифференцировки.	<p>Необходимость оптимизации параметров.</p> <p>Риск механического повреждения клеток, приводящего к гибели.</p>	[26, 27]
Использование цитоплазматических экстрактов остеобластов	Такие лизаты богаты огромным количеством различных цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, которые, в свою очередь, активируют сигнальные каскады.	<p>Усиленная эффективность остеогенной дифференцировки по сравнению с использованием конкретного числа молекул-индукторов.</p> <p>В условиях <i>in vivo</i> демонстрируют сниженную иммуногенность и туморогенность.</p>	<p>Отсутствует стандартизация.</p> <p>Трудность в получении: требуется большое количество дифференцированных клеток.</p> <p>В зависимости от источника клеток варьируется состав.</p>	[28, 29]

процесса остеокластогенеза в условиях организма [38]. Тем не менее, использование первичных культур МСК представляется незаменимым в ряде исследований, например, в сфере регенеративной медицины. При этом показано, что МСК, полученные от пациентов с остеопорозом, имеют сниженный потенциал к дифференцировке в остеобласты [39]. Предполагается, что причины снижения компетентности к остеодифференцировке МСК от пациентов с остеопорозом преимущественно следующие: пониженная пролиферативная активность, секреция матрикса с малым содержанием коллагена I типа (основного белкового компонента) и сдвиг баланса в сторону адипогенной дифференцировки [40].

В контексте регенеративной медицины существуют три основных практических подхода к использованию МСК в терапии различных патологий:

1. Свежеизолированные МСК могут быть трансплантированы в ткань-мишень, где они в условиях *in vivo* проходят дифференцировку в нужный тип клеток.

2. Могут быть осуществлены манипуляции, предшествующие введению МСК в организм. Например, при помощи методов генной инженерии в мезенхимных стволовых клетках предварительно индуцируют экспрессию определенных генов или пре-дифференцируют их.

3. Введение определенных цитокинов вызывает рекрутирование циркулирующих эндогенных МСК в места травм и повреждений, стимулирует их дальнейшую миграцию, пролиферацию, адгезию и дифференцировку [41].

Более подробно перспективы в области применения МСК для решения задач регенеративной медицины обсуждаются в разделе 4 настоящего обзора.

3. Процесс дифференцировки остеобластов в остециты в условиях организма

Терминальный этап дифференцировки остеобластов — преобразование их в остециты. В составе КТ остециты являются преобладающей популяцией клеток, составляя до 90–95 % от общего числа последних [42]. Процесс перехода остеобластов в остециты сопровождается кардинальным изменением морфологии и функциональной активности остеобластов: сокращается интенсивность секреции матриксных белков, клетки приобретают характерную звездчатую форму. Также меняется профиль экспрессии отдельных генов-маркеров на соответствующий тому в остеоцитах [43]. В ответ на внешние механические стимулы остециты вырабатывают вещества, способные модули-

ровать активность остеобластов и остеокластов, балансируя их таким образом, чтобы минеральная плотность костной ткани наиболее оптимально отвечала меняющимся нагрузкам (более подробно секретируемые остеоцитами биоактивные вещества обсуждаются далее). Это возможно благодаря анатомическому строению КТ и расположению остеоцитов в ее составе (рис. 2) [44].

Путь от остеобласта до остеоцита состоит в постепенном погружении остеобласта в секретируемый им матрикс, состоящий из коллагеновых волокон, который затем постепенно подвергается минерализации. Клетки на такой стадии в литературе принято обозначать как остеодные остециты [45]. Остеод — это гомогенный органический, не подвергшийся минерализации костный матрикс, производимый остеобластами в процессе (ре)моделирования КТ [46]. По мере появления участков минерализации на поверхности остеодных остеоцитов, обращенных к ним, формируются отростки. Эти отростки, по мере дальнейшей кальцификации коллагеновых волокон, будут ветвиться, а остеод — продолжать уменьшаться в объеме, становясь сначала незрелым остеодом, а затем и зрелым. Процесс превращения остеобластов в остециты связан с рядом изменений в транскрипционном профиле [45]. Так, на клеточной линии IDG-SW3 было показано, что эти изменения индуцируются ограничением поступления глюкозы из-за низкой васкуляризации минерализованной КТ и касаются AMPK (АМФ-активируемая протеинкиназа) и PGC-1 (активируемый пролиферацией ко-активатор γ рецептора 1). Активация сигнального пути AMPK/PGC-1 приводит к запуску транскрипции генов, характерных для остеоцитов [47]. Данные изменения означают, что переход от остеобластов к остеоцитам сопровождается существенными изменениями биоэнергетического статуса клетки, приводящими к интенсификации работы митохондрий. Профиль экспрессии генов меняется, и остециты начинают производить характерные для них белки: E11/gp38, Dmp1, MEPE, PHEX и склеростин [45]. Dmp1, MEPE и PHEX являются регуляторами минерализации. Так, E11/gp38 экспрессируется раньше всех, определяя дальнейший остеодогенез [48]. В то время как MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein/Фосфогликопротеин внеклеточного матрикса) важен для модификации процесса минерализации в микроокружении остеоцита в ответ на внешние механические стимулы [49]. Дентиновый матриксный белок 1 (Dmp1/Dentin Matrix Protein 1) вовлечен в процесс формирования очагов минерализации

и предотвращает апоптоз остеоцитов, способствуя их созреванию [50]. Белковый продукт гена *PHEX* (the Phosphate-regulating gene with Homologies to Endopeptidases on X-chromosome/Ген фосфатного регулятора, гомологичный эндопептидазам на X-хромосоме) отвечает за поддержание гомеостаза фосфатов [49]. Склеростин — это механорегулируемая сигнальная молекула, которая вовлечена в процесс ремоделирования костной ткани, и его роль обсуждается далее [51].

Особый интерес представляют механизмы, позволяющие остеоцитам ощущать и отвечать на стимулы механической природы. Тела остеоцитов находятся в пространствах минерализованного матрикса, называемых лакунами. Их отростки залегают в канальцах, в литературе обозначаемых как каналикулы, они формируют нейрон-подобную сеть, обеспечивая коммуникацию с другими остеоцитами, а также остеобластами и остеокластами на поверхности, где происходит ремоделирование КТ. Остеоциты отделены от минерализованного матрикса перичеллюлярным пространством, заполненным интерстициальной жидкостью и гликокаликсом. Эта морфологически сложная структура обеспечивает передачу сигналов и регуляцию и называется лакунарно-каналикулярной системой [52]. Одной из ярких характеристик

остеоцитов является их механочувствительность. Кость, как элемент опорно-двигательной системы, ежедневно подвергается действию механических сил вследствие оказываемой нагрузки, среди них — гравитация, а также флуктуации тока интерстициальной жидкости и деформация матрикса. Для того чтобы улавливать эти изменения, остеоциты обладают внушительным арсеналом механосенсоров на своей поверхности [42]. Эти сенсоры способны передавать информацию о внеклеточных факторах внутрь остеоцита, задействуя разные сигнальные пути и механизмы. Среди таких механосенсоров наиболее изученными являются: коннексиновые и паннексиновые каналы, механочувствительные ионные каналы, интегринны, первичные реснички, а также кавеолы (рис. 3). Проведение механических сигналов обеспечивает перичеллюлярный матрикс, находящийся между отростками остеоцита и стенками лакунарно-каналикулярной системы, состоящими из минерализованного костного матрикса [52].

Таким образом, популяция остеоцитов костной ткани является важным регуляторным центром. За счет сложноорганизованной лакунарно-каналикулярной сети остеоциты сообщаются друг с другом, улавливают изменения механического напряжения и влияют на гомеостаз костной ткани.

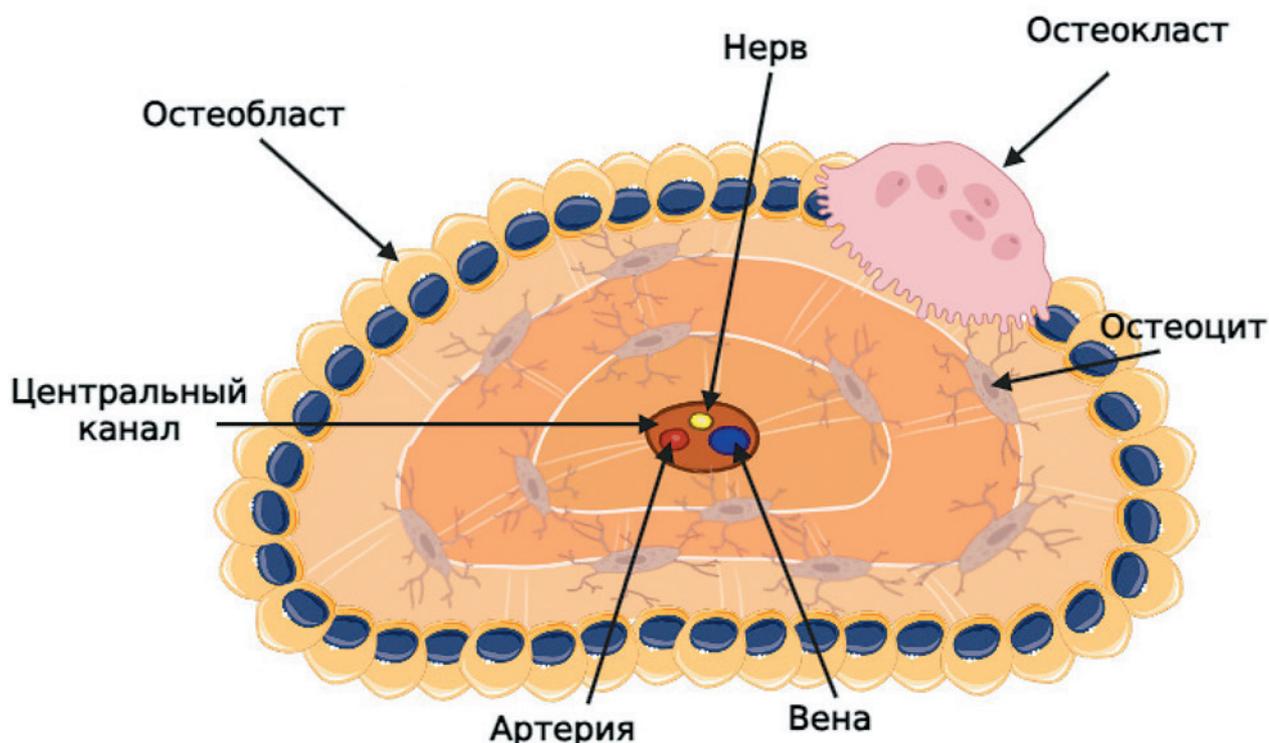


Рис. 2. Схема строения остеона и основные клеточные популяции, входящие в его состав

Figure 2. Schematic structure of osteon and main cellular populations in it

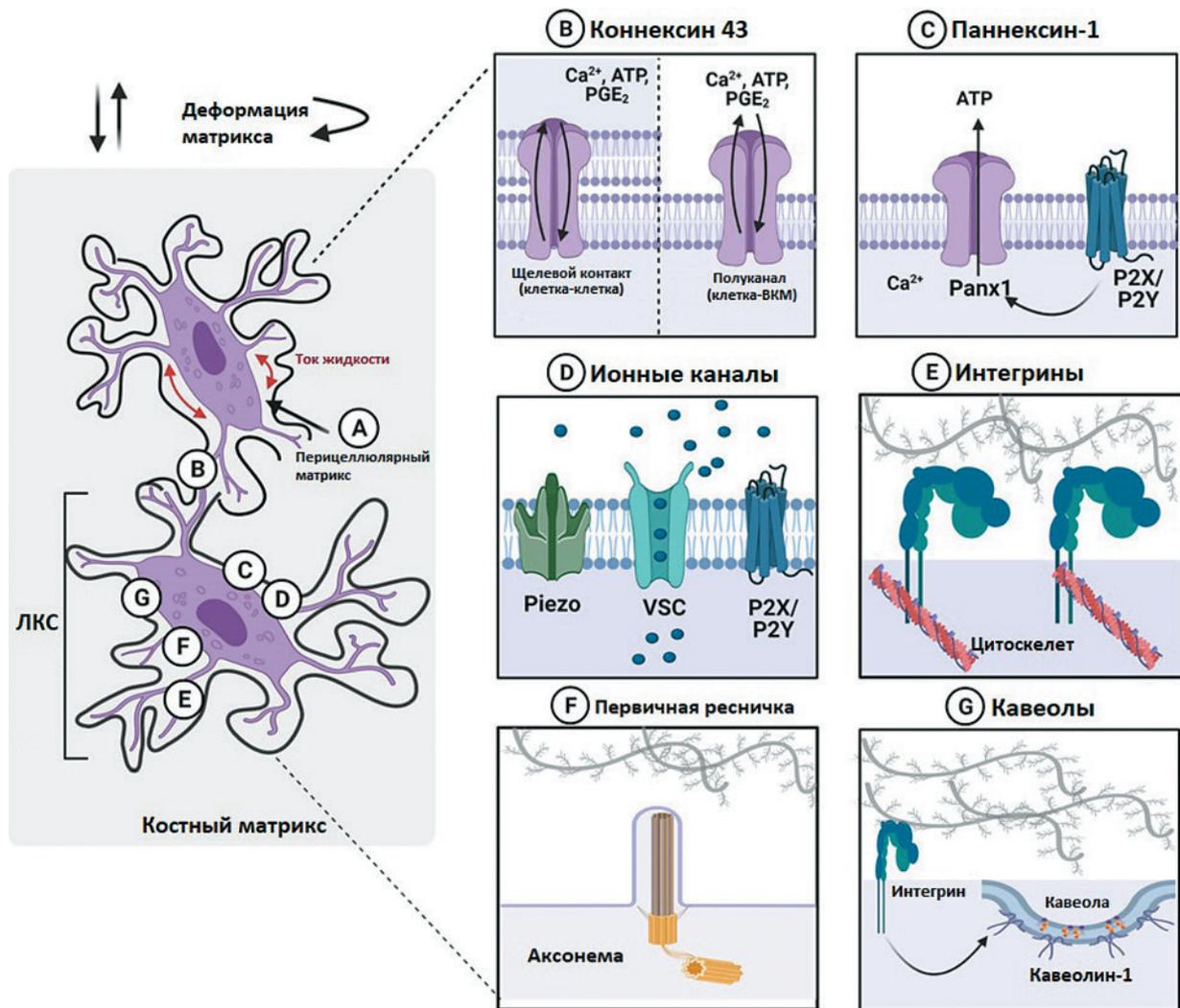


Рис. 3. Элементы механосенсорного аппарата остеоцитов и их локализация (адаптировано из [Choi, et al. The Mechanosensory Role of Osteocytes and Implications for Bone Health and Disease States, 2022])

Примечания: ЛКС — лакунарно-каналюлярная система; ВКМ — внеклеточный матрикс; АТФ — аденозинтрифосфат; PGE₂ — простагландин E₂; VSC (от англ. voltage-sensitive calcium channel) — активируемый напряжением кальциевый ионный канал; P2X/P2Y — пуриnergические ионные каналы.

Figure 3. The mechanosensory apparatus of osteocyte: main structural units and its' localization (adapted from [Choi, et al. The Mechanosensory Role of Osteocytes and Implications for Bone Health and Disease States, 2022])

4. Получение остеоцитов в условиях *in vitro* и совместное их культивирование с остеобластами

Как уже обсуждалось ранее, остеоциты, будучи терминально дифференцированными остеобластами, продолжают выполнять регуляторную роль по отношению к процессу ремоделирования КТ. Что, в свою очередь, объясняет интерес исследователей к подходам получения остеоцитов в условиях *in vitro* и совместному их культивированию с остеобластами.

Получение остеоцитов в лабораторных условиях представляет собой непростую задачу, поскольку локализация остеоцитов в минерализованном матриксе затрудняет проведение любых манипуляций в их отношении. Кроме того, остеоциты представляют собой терминально-дифференцированные постмитотические клетки, что не позволяет увеличивать их количество в культуре [53]. Одним из подходов является выделение остеоцитов из гипоминерализованной ткани. Однако получаемая таким способом культура клеток должна характе-

ризоваться высоким уровнем гомогенности [54]. Получение остеоцитов из клеток остеобластного ряда в культуре возможно также методом формирования 3D-сфероидов [55]. При этом предполагается, что дифференцировка МСК в остеоциты в сфероидах достигается за счет снижения полимеризации F-актина. В приведенном исследовании обработка сфероидов цитохалазином D, ингибирующим полимеризацию актина, привела к усилению экспрессии маркеров остеоцитов (склеростина, PHEX). В то время как в 2D-культуре в норме происходят сборка мощных актиновых филаментов и дифференцировка только в остеоциты. Такой способ дифференцировки в остеоциты посредством формирования сфероидов показывает большую эффективность по сравнению с получением остеоцитов в монослойной культуре [56]. Авторы данного исследования предполагают, что при культивировании в сфероидах остеоциты

дифференцируются не из зрелых остеобластов, а напрямую из МСК. О чем свидетельствует профиль экспрессии маркеров: снижается экспрессия остеобластических — *RUNX2*, *OSTERIX*, *ALP*, *COL1A1* и *DLX5*; при этом повышается экспрессия генов-маркеров остеоцитов — *PHEX*, *DMP1*, *SOST* [57]. В то же время такой способ индукции дифференцировки позволяет получить культуру остеоцитов всего за несколько дней, однако, точные механизмы и релевантность данного подхода еще только исследуются.

Системы сокультивирования остеоцитов с остеобластами наиболее изучены с использованием клеточных культур, полученных из тканей мышей [58]. Причиной этого является низкий уровень минерализации костной ткани, в связи с чем выделение остеоцитов проводится с большей эффективностью. Существуют способы дифференцировки остеобласт-подобных клеточных линий

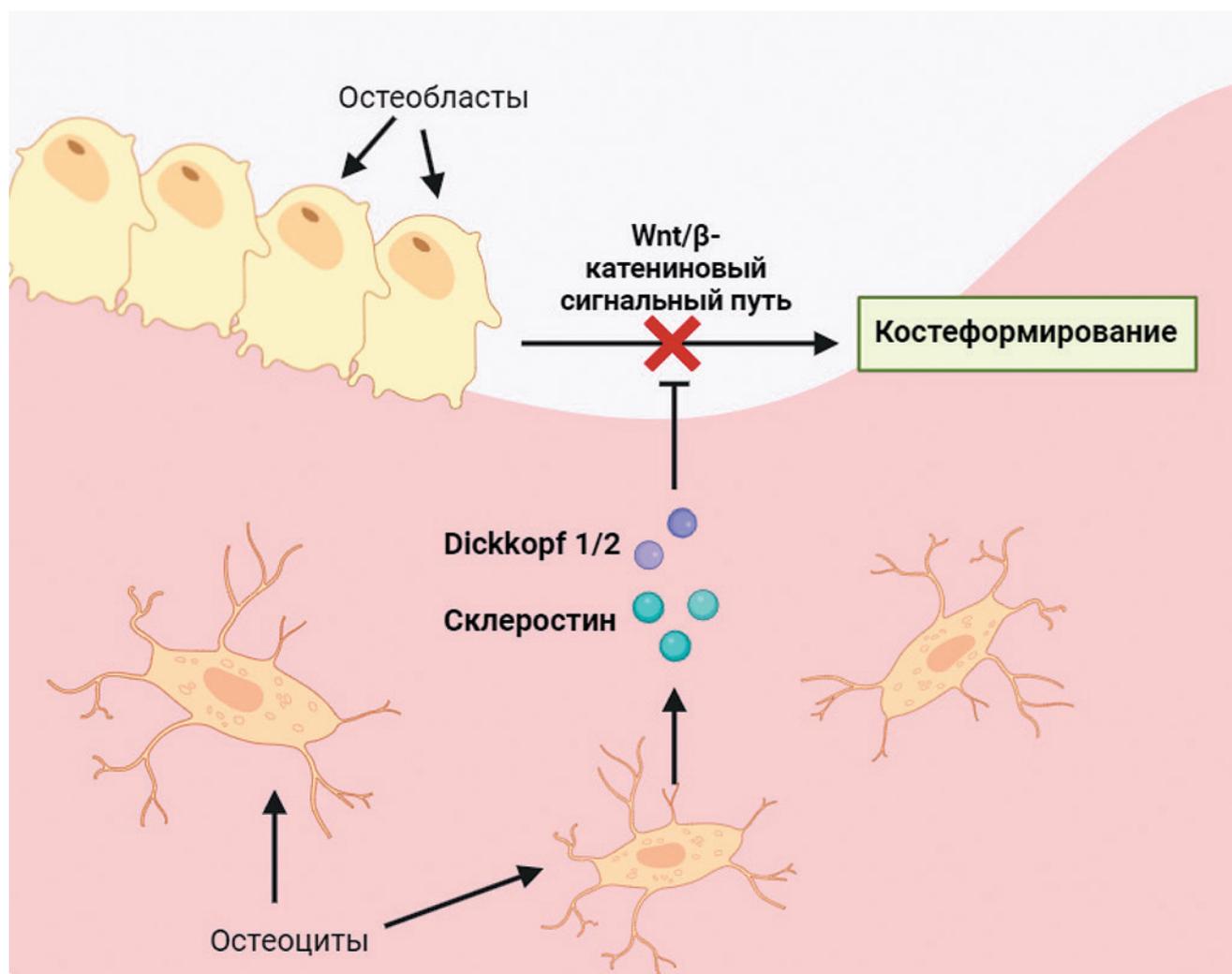


Рис. 4. Схематическое представление регуляции остеоцитами активности остеобластов

Figure 4. Schematic representation of regulation of osteoblasts' activity by osteocytes

в остециты в условиях *in vitro*. Они предполагают наличие коллагеновых 2D-подложек и 3D-структур. Вариабельность в приготовлении матриц приводит к изменениям в параметрах их жесткости и влияет на эффективность дифференцировки. Однако эта корреляция не является прямой. Так, подложки с меньшей жесткостью (0,3 кПа) стимулировали клетки к дифференцировке в остециты. При этом повышение параметра жесткости приводило к преимущественному сдвигу дифференцировки в остеобластном направлении [59].

Как было упомянуто ранее, одним из основных сигнальных путей, запускающих коммитирование и дифференцировку остеобластов, является канонический Wnt/ β -катениновый сигналинг. Его активация приводит к накоплению β -катенина в цитоплазме, который затем транслоцируется в ядро и запускает экспрессию *RUNX2*. Таким образом, в регуляцию формирования костной ткани вносят вклад остециты, поскольку они способны секретировать склеростин, который ингибирует Wnt-сигналинг (рис. 4). Секрета остеоцитами склеростина (*SOST*) и белков *DKK1/2* (*Dickkopf 1/2*) предотвращает дальнейшее формирование кости и является характерной чертой «покоящейся» костной ткани [2]. Так, показано, что у пациентов с остеопорозом наблюдается повышенный уровень склеростина, что подтверждает значимость изучения роли остецитов в патогенезе остеопороза [60].

Одно из первых исследований Skottke и коллег (2019) было направлено на прямое сокультивирование первичных культур остецитов с остеобластами человека. Остециты выделяли напрямую из ткани, а также дифференцировали в лабораторных условиях из пре-osteобластов. При этом обнаруживались небольшие различия в экспрессии генов-маркеров. Так, в изолированных из КТ остеоцитах наблюдали высокий уровень экспрессии склеростина и *RANKL* и более низкий *RHEX*. По результатам анализа такой системы совместного культивирования было выявлено существенное повышение экспрессии остеокальцина остеобластами и незначительное повышение экспрессии генов, кодирующих *RANKL*, щелочную фосфатазу и костный сиалопротеин II типа в остеобластах. Остециты культивировали на коллагеновых гелях, что, естественно, не способно полностью воспроизвести нативные условия. Тем не менее, использование коллагеновых гелей позволяет остеоцитам формировать отростки. В ходе работы авторы столкнулись с множеством сложностей: при сокультивировании остеобласты засевали на поверхность матрикса, в котором были остео-

циты. С течением времени остеобласты мигрировали внутрь, что не соответствует организации процесса ремоделирования в условиях организма. К тому же для культивирования остеоцитов используется среда с низким содержанием сыворотки, в то время как для остеобластов необходима более высокая ее концентрация [61].

Skottke и коллеги (2019) указали на возможные проблемы при создании модели совместной культуры остеобластов с остеоцитами в условиях *in vitro*. Однако подобные исследования, по данным авторов [53], единичны и в основном сконцентрированы на разработке оптимальных протоколов [62–64]. Это может быть следствием трудоемкости в создании сбалансированной системы модели взаимодействий «остеобласты-остеоциты», что требует дальнейших исследований. Последующие работы в этом направлении сосредотачиваются преимущественно на совместном культивировании трех основных типов клеток, участвующих в процессе ремоделирования КТ: остеобластов, остеоцитов и остеокластов [53, 65, 66]. Такая система сокультивирования является наиболее релевантной, поскольку максимально возможно приближена к процессам, происходящим в условиях *in vivo* в трехмерном пространстве. Однако преобладающее количество исследований направлено на изучение совместного культивирования остеобластов с остеокластами, как противоположно функционирующих участников процесса ремоделирования КТ. Подробнее совместное культивирование остеобластов с остеокластами рассмотрено в следующих работах [67–70].

Подход к изучению процесса ремоделирования с использованием пациент-специфичных культур клеток позволяет рассматривать также фактор фенотипической вариабельности. Что учитывает индивидуальные генетические и эпигенетические особенности доноров и, как следствие, дает возможность направленно оценивать эффективность различных подходов персонализированной регенеративной медицины.

Более подробно использование МСК в целях тканевой инженерии рассмотрено в следующих работах [71–74]. Схожие стратегии, основанные на введении МСК в комбинации со скаффолдами и остеоиндуктивными молекулами, активно исследуются, в том числе, в контексте терапии остеопороза [75–77]. Так, создание 3D-систем сокультивирования пациент-специфичных клеток отражает индивидуальные различия в паттернах экспрессии различных маркеров, структурные особенности клеточных рецепторов и, как следствие, возможные изменения в процессах межклеточных

взаимодействий, ремоделирования КТ, а также позволяет проследить генетически обусловленные особенности патогенеза остеопороза [40, 78–80]. Внедрение получения пациент-специфичных клеток открывает широкий спектр возможностей для ранней диагностики патологий КТ, выявления молекул-кандидатов на роль ранних маркеров различных патофизиологических состояний, а также скрининга эффективности разных групп фармакологических препаратов. К сожалению, ограниченное количество исследований процесса костного ремоделирования в контексте персонализированной медицины сдерживает применение подобных подходов в клинической практике.

Заключение

Остеоциты, являясь терминально-дифференцированными остеобластами, остаются функционально активными участниками процесса ремоделирования костной ткани, происходящего на протяжении всей жизни. Важность изучения аспектов взаимодействия остеоцитов с остеобластами определяется их способностью влиять на остеобласты, тем самым регулируя процесс формирования костной ткани. Сложность протоколов и недостаток знаний в области создания релевантной модели взаимодействий этих двух типов клеток являются лимитирующими факторами в точном понимании фундаментальных механизмов процесса ремоделирования костной ткани.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021). / This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1075, signed 28.09.2021) “Generation of the Patient-Specific Cellular Models of Bone Diseases Associated with Mutations in GPCRs”.

Список литературы / References

1. Zhivodernikov IV, Kirichenko TV, Markina YV, et al. Molecular and Cellular Mechanisms of Osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(21). DOI: 10.3390/ijms242115772.

2. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018;55(3):308–27. DOI: 10.1177/0004563218759371.

3. Krasnova O, Neganova I. Assembling the Puzzle Pieces. Insights for in Vitro Bone Remodeling. *Stem Cell Rev Rep.* 2023;19(6):1635–1658. DOI: 10.1007/s12015-023-10558-6.

4. Ding P, Gao C, Gao Y, et al. Osteocytes regulate senescence of bone and bone marrow. *Elife.* 2022;11. DOI: 10.7554/eLife.81480.

5. Stains JP, Watkins MP, Grimston SK, et al. Molecular mechanisms of osteoblast/osteocyte regulation by connexin43. *Calcif Tissue Int.* 2013;94(1):55–67. DOI: 10.1007/s00223-013-9742-6.

6. Tu X, Delgado-Calle J, Condon KW, et al. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/beta-catenin signaling in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(5):E478–86. DOI: 10.1073/pnas.1409857112

7. Rhee Y, Lee EY, Lezcano V, et al. Resorption controls bone anabolism driven by parathyroid hormone (PTH) receptor signaling in osteocytes. *J Biol Chem.* 2013;288(41):29809–20. DOI: 10.1074/jbc.M113.485938.

8. Chen Y, Xiao H, Liu Z, et al. Sirt1: An Increasingly Interesting Molecule with a Potential Role in Bone Metabolism and Osteoporosis. *Biomolecules.* 2024;14(8). DOI: 10.3390/biom14080970.

9. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(1):19–26. DOI: 10.1007/s00774-020-01162-6.

10. Breathwaite E, Weaver J, Odanga J, et al. 3D Bioprinted Osteogenic Tissue Models for In Vitro Drug Screening. *Molecules.* 2020;25(15). DOI: 10.3390/molecules25153442.

11. Chen J, Liu D, Chen B, et al. The histone acetyltransferase Mof regulates Runx2 and Osterix for osteoblast differentiation. *Cell Tissue Res.* 2023;393(2):265–279. DOI: 10.1007/s00441-023-03791-5.

12. Riancho JA, Delgado-Calle J. [Osteoblast-osteoclast interaction mechanisms]. *Reumatol Clin.* 2011;7 Suppl 2:S1–4. DOI: 10.1016/j.reuma.2011.03.003.

13. Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res.* 2013;92(10):860–7. DOI: 10.1177/0022034513500306.

14. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746. DOI: 10.1155/2015/421746.

15. Sims NA, Vrahnas C. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:22–8. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.015.

16. Kitase Y, Prideaux M. Targeting osteocytes vs osteoblasts. *Bone.* 2023;170:116724. DOI: 10.1016/j.bone.2023.116724.

17. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater.* 2014;28:269–286. DOI: 10.22203/ecm.v028a19.

18. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:3–12. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.003.
19. Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13). DOI: 10.3390/ijms22136651.
20. Heng BC, Cao T, Stanton LW, et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res.* 2004;19(9):1379–1394. DOI: 10.1359/JBMR.040714.
21. Valdoz JC, Johnson BC, Jacobs DJ, et al. The ECM: To Scaffold, or Not to Scaffold, That Is the Question. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12690. DOI: 10.3390/ijms222312690.
22. Xing Q, Qian Z, Kannan B, et al. Osteogenic Differentiation Evaluation of an Engineered Extracellular Matrix Based Tissue Sheet for Potential Periosteum Replacement. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(41):23239–47. DOI: 10.1021/acsami.5b07386.
23. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2001;11(4):173–186. DOI: 10.1159/000047804.
24. Zhang M, Dai GC, Zhang YW, et al. Enhancing osteogenic differentiation of diabetic tendon stem/progenitor cells through hyperoxia: Unveiling ROS/HIF-1 α signalling axis. *J Cell Mol Med.* 2024;28(20):e70127. DOI: 10.1111/jcmm.70127.
25. Sheppard AJ, Barfield AM, Barton S, Dong Y. Understanding Reactive Oxygen Species in Bone Regeneration: A Glance at Potential Therapeutics and Bioengineering Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:836764. DOI:10.3389/fbioe.2022.836764.
26. Lim KT, Hexiu J, Kim J, et al. Synergistic effects of orbital shear stress on in vitro growth and osteogenic differentiation of human alveolar bone-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:316803. DOI: 10.1155/2014/316803.
27. Lim K, Kim J, Seonwoo H, et al. In vitro effects of low-intensity pulsed ultrasound stimulation on the osteogenic differentiation of human alveolar bone-derived mesenchymal stem cells for tooth tissue engineering. *Biomed Res Int.* 2013;2013:269724. DOI: 10.1155/2013/269724.
28. Tangporncharoen R, Silathapanasakul A, Tragoonlugkana P, et al. The extracts of osteoblast developed from adipose-derived stem cell and its role in osteogenesis. *J Orthop Surg Res.* 2024;19(1):255. DOI: 10.1186/s13018-024-04747-3.
29. Han Y, Yang J, Fang J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):92. DOI: 10.1038/s41392-022-00932-0.
30. Mollentze J, Durandt C, Pepper MS. An In Vitro and In Vivo Comparison of Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2021;2021:9919361. DOI: 10.1155/2021/9919361.
31. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4:117. DOI: 10.1186/scrt328.
32. Lyu LX, Zhang XF, Deegan AJ, et al. Comparing hydroxyapatite with osteogenic medium for the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on PHBV nanofibrous scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019;30(2):150–161. DOI: 10.1080/09205063.2018.1558485.
33. Wang L, Li ZY, Wang YP, et al. Dynamic Expression Profiles of Marker Genes in Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Chin Med Sci J.* 2015;30(2):108–113. DOI: 10.1016/s1001-9294(15)30021-3.
34. Kostina D, Lobov A, Klausen P, et al. Isolation of Human Osteoblast Cells Capable for Mineralization and Synthesizing Bone-Related Proteins In Vitro from Adult Bone. *Cells.* 2022;11(21):3356. DOI: 10.3390/cells11213356.
35. Choi KM, Seo YK, Yoon HH, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng.* 2008;105(6):586–594. DOI: 10.1263/jbb.105.586.
36. Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 2003;90(1):13–22. DOI: 10.1002/jcb.10592.
37. Fiorentini E, Granchi D, Leonardi E, et al. Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells. *Int J Artif Organs.* 2011;34(10):998–1011. DOI: 10.5301/ijao.5000001.
38. Brown C, McKee C, Bakshi S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(9):1738–1755. DOI: 10.1002/term.2914.
39. Pino AM, Rosen CJ, Rodriguez JP. In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. *Biol Res.* 2012;45(3):279–287. DOI: 10.4067/S0716-97602012000300009.
40. Prall WC, Haasters F, Heggebo J, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;440(4):617–622. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.114.
41. Lin H, Sohn J, Shen H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials.* 2019;203:96–110. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.026.
42. Qin L, Liu W, Cao H, Xiao G. Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone Res.* 2020;8:23. DOI: 10.1038/s41413-020-0099-y.
43. Delgado-Calle J, Bellido T. The osteocyte as a signaling cell. *Physiol Rev.* 2022;102(1):379–410. DOI: 10.1152/physrev.00043.2020.

44. Hart NH, Newton RU, Tan J, et al. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2020;20(3):347–71. http://www.ismni.org/jmni/pdf/81/jmni_20_347.pdf
45. Marahleh A, Kitaura H, Ohori F, et al. The osteocyte and its osteoclastogenic potential. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1121727. DOI: 10.3389/fendo.2023.1121727.
46. Palander A, Fauch L, Turunen MJ, et al. Molecular Quantity Variations in Human-Mandibular-Bone Osteoid. *Calcif Tissue Int.* 2022;111(6):547–558. DOI: 10.1007/s00223-022-01017-4.
47. Sanchez-de-Diego C, Artigas N, Pimenta-Lopes C, et al. Glucose Restriction Promotes Osteocyte Specification by Activating a PGC-1alpha-Dependent Transcriptional Program. *iScience.* 2019;15:79–94. DOI: 10.1016/j.isci.2019.04.015.
48. Prideaux M, Loveridge N, Pitsillides AA, Farquharson C. Extracellular matrix mineralization promotes E11/gp38 glycoprotein expression and drives osteocytic differentiation. *PLoS One.* 2012;7(5):e36786. DOI: 10.1371/journal.pone.0036786.
49. Donmez BO, Karagur ER, Donmez AC, et al. Calciumdependent activation of PHEX, MEPE and DMP1 in osteocytes. *Mol Med Rep.* 2022;26(6):359. DOI: 10.3892/mmr.2022.12876.
50. Dussold C, Gerber C, White S, et al. DMP1 prevents osteocyte alterations, FGF23 elevation and left ventricular hypertrophy in mice with chronic kidney disease. *Bone Res.* 2019;7:12. DOI: 10.1038/s41413-019-0051-1.
51. Verbruggen SW. Role of the osteocyte in bone metastasis – The importance of networking. *J Bone Oncol.* 2024;44:100526. DOI: 10.1016/j.jbo.2024.100526.
52. Choi JUA, Kijas AW, Lauko J, Rowan AE. The Mechanosensory Role of Osteocytes and Implications for Bone Health and Disease States. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9:770143. DOI: 10.3389/fcell.2021.770143.
53. Bernhardt A, Skottke J, von Witzleben M, Gelinsky M. Triple Culture of Primary Human Osteoblasts, Osteoclasts and Osteocytes as an In Vitro Bone Model. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7316. DOI: 10.3390/ijms22147316.
54. van der Plas A, Aarden EM, Feijen JH, et al. Characteristics and properties of osteocytes in culture. *J Bone Miner Res.* 1994;9(11):1697–1704. DOI: 10.1002/jbmr.5650091105.
55. Nasello G, Alaman-Diez P, Schiavi J, et al. Primary Human Osteoblasts Cultured in a 3D Microenvironment Create a Unique Representative Model of Their Differentiation Into Osteocytes. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:336. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00336.
56. Kim J, Adachi T. Cell-fate decision of mesenchymal stem cells toward osteocyte differentiation is committed by spheroid culture. *Sci Rep.* 2021;11(1):13204. DOI: 10.1038/s41598-021-92607-z.
57. Kim J, Adachi T. Cell Condensation Triggers the Differentiation of Osteoblast Precursor Cells to Osteocyte-Like Cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:288. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00288.
58. Shah KM, Stern MM, Stern AR, et al. Osteocyte isolation and culture methods. *Bonekey Rep.* 2016;5:838. DOI: 10.1038/bonekey.2016.65.
59. Mc Garrigle MJ, Mullen CA, Haugh MG, et al. Osteocyte differentiation and the formation of an interconnected cellular network in vitro. *Eur Cell Mater.* 2016;31:323–340. DOI: 10.22203/ecm.v031a21.
60. Gregg C, Cariati I, Onorato F, et al. PTX3 Effects on Osteogenic Differentiation in Osteoporosis: An In Vitro Study. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5944. DOI: 10.3390/ijms22115944.
61. Skottke J, Gelinsky M, Bernhardt A. In Vitro Co-culture Model of Primary Human Osteoblasts and Osteocytes in Collagen Gels. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1998. DOI: 10.3390/ijms20081998.
62. Yvanoff C, Willaert RG. Development of bone cell microarrays in microfluidic chips for studying osteocyte-osteoblast communication under fluid flow mechanical loading. *Biofabrication.* 2022;14(2). DOI: 10.1088/1758-5090/ac516e.
63. Zhou YH, Guo Y, Zhu JY, et al. Spheroid co-culture of BMSCs with osteocytes yields ring-shaped bone-like tissue that enhances alveolar bone regeneration. *Sci Rep.* 2022;12(1):14636. DOI: 10.1038/s41598-022-18675-x.
64. Vazquez M, Evans BA, Riccardi D, et al. A new method to investigate how mechanical loading of osteocytes controls osteoblasts. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:208. DOI: 10.3389/fendo.2014.00208.
65. Wirsig K, Kilian D, von Witzleben M, et al. Impact of Sr(2+) and hypoxia on 3D triple cultures of primary human osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Eur J Cell Biol.* 2022;101(3):151256. DOI: 10.1016/j.ejcb.2022.151256.
66. Wirsig K, Bacova J, Richter RF, et al. Cellular response of advanced triple cultures of human osteocytes, osteoblasts and osteoclasts to high sulfated hyaluronan (sHA3). *Mater Today Bio.* 2024;25:101006. DOI: 10.1016/j.mtbio.2024.101006.
67. Remmers SJA, de Wildt BWM, Vis MAM, et al. Osteoblast-osteoclast co-cultures: A systematic review and map of available literature. *PLoS One.* 2021;16(11):e0257724. DOI: 10.1371/journal.pone.0257724.
68. Lambertini E, Penolazzi L, Pandolfi A, et al. Human osteoclasts/osteoblasts 3D dynamic coculture system to study the beneficial effects of glucosamine on bone microenvironment. *Int J Mol Med.* 2021;47(4):57. DOI: 10.3892/ijmm.2021.4890.
69. Zhu S, Haussling V, Aspera-Werz RH, et al. Bisphosphonates Reduce Smoking-Induced Osteoporotic-Like Alterations by Regulating RANKL/OPG in an Osteoblast and Osteoclast Co-Culture Model. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):53. DOI: 10.3390/ijms22010053.

70. Sieberath A, Della Bella E, Ferreira AM, et al. A Comparison of Osteoblast and Osteoclast In Vitro Co-Culture Models and Their Translation for Preclinical Drug Testing Applications. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):912. DOI: 10.3390/ijms21030912.

71. Xie C, Liang R, Ye J, et al. High-efficient engineering of osteo-callus organoids for rapid bone regeneration within one month. *Biomaterials.* 2022;288:121741. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121741.

72. Confalonieri D, Schwab A, Walles H, Ehlicke F. Advanced Therapy Medicinal Products: A Guide for Bone Marrow-derived MSC Application in Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018;24(2):155–169. DOI: 10.1089/ten.TEB.2017.0305.

73. Shanbhag S, Kamplaitner C, Al-Sharabi N, et al. Functionalizing Collagen Membranes with MSC-Conditioned Media Promotes Guided Bone Regeneration in Rat Calvarial Defects. *Cells.* 2023;12(5):767. DOI: 10.3390/cells12050767.

74. Conrad B, Yang F. Hydroxyapatite-coated gelatin microribbon scaffolds induce rapid endogenous cranial bone regeneration in vivo. *Biomater Adv.* 2022;140:213050. DOI: 10.1016/j.bioadv.2022.213050.

75. Arjmand B, Sarvari M, Alavi-Moghadam S, et al. Prospect of Stem Cell Therapy and Regenerative Medicine in Osteoporosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:430. DOI: 10.3389/fendo.2020.00430.

76. Phetfong J, Sanvoranart T, Nartprayut K, et al. Osteoporosis: the current status of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Biol Lett.* 2016;21:12. DOI: 10.1186/s11658-016-0013-1.

77. Theodosaki AM, Tzemi M, Galanis N, et al. Bone Regeneration with Mesenchymal Stem Cells in Scaffolds: Systematic Review of Human Clinical Trials. *Stem Cell Rev Rep.* 2024;20(4):938–966. DOI: 10.1007/s12015-024-10696-5.

78. Ansari S, Ito K, Hofmann S. Cell Sources for Human In vitro Bone Models. *Curr Osteoporos Rep.* 2021;19(1):88–100. DOI: 10.1007/s11914-020-00648-6.

79. Fong ELS, Toh TB, Yu H, Chow EK. 3D Culture as a Clinically Relevant Model for Personalized Medicine. *SLAS Technol.* 2017;22(3):245–253. DOI: 10.1177/2472630317697251.

80. Rodriguez JP, Rios S, Fernandez M, Santibanez JF. Differential activation of ERK1,2 MAP kinase signaling pathway in mesenchymal stem cell from control and osteoporotic postmenopausal women. *J Cell Biochem.* 2004;92(4):745–754. DOI: 10.1002/jcb.20119.

Информация об авторах:

Ковалева Анастасия Андреевна, старший лаборант-исследователь лаборатории молекулярной медицины, ФГБУН ИИЦ РАН;

Краснова Ольга Александровна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной медицины, ФГБУН ИИЦ РАН;

Неганова Ирина Эриковна, к.б.н., заведующий лабораторией молекулярной медицины, ФГБУН ИИЦ РАН.

Authors information:

Anastasiia A. Kovaleva, senior laboratory technician, Laboratory of molecular medicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences;

Olga A. Krasnova, junior research assistant, Laboratory of molecular medicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences;

Irina E. Neganova, PhD, head at Laboratory of molecular medicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences.