

УДК 615.46, 57.086.862

Differentiation of MSCs into Osteoblasts on a Porous 3D -Carrier of Poly-3-Hydroxybutyrate

Anna A. Shumilova^{a*} and Elena D. Nikolaeva^{a,b}

*^aInstitute of Biophysics of SB RAS
50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

*^bSiberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

Received 19.10.2015, received in revised form 26.12.2015, accepted 10.01.2016

The study describes preparation and testing of porous 3D implants of natural degradable polymer of 3-hydroxybutyric acid [P(3HB)] for regeneration of bone tissue defects. The ability of the 3D carriers to favor attachment and facilitate proliferation and directed differentiation into osteoblasts of mesenchymal stem cells (MSCs) was studied in the culture of MSCs isolated from bone marrow and adipose tissue. MSC differentiation into osteoblasts was confirmed by measurements of the activity of alkaline phosphatase, gene expression of the marker of bone protein BGP (glutamic protein participating in mineralization) and measurements of intracellular precipitates of calcium and phosphorus salts.

Keywords: cellular carrier, poly-3-hydroxybutyrate, mesenchymal stem cells, differentiation, osteoblasts.

DOI: 10.17516/1997-1389-2015-9-1-53-62.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: shumilova.ann@mail.ru

Дифференцировка ММСК в остеобласты на пористых 3D-носителях из поли-3-гидроксibuтирата

А.А. Шумилова^а, Е.Д. Николаева^{а,б}

^а*Институт биофизики СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50*

^б*Сибирский федеральный университет
Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79*

В настоящей статье разработаны и исследованы экспериментальные пористые 3D-носители из разрушаемого природного полимера 3-гидроксимасляной кислоты [П(ЗГБ)], предназначенные для восстановления дефектов костной ткани. Способность разработанных 3D-носителей поддерживать адгезию, пролиферацию и направленную дифференцировку клеток в остеобластическом направлении исследована в культуре мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), выделенных из костного мозга и жировой ткани. Дифференцировка ММСК в остеобласты подтверждена измерением активности щелочной фосфатазы, экспрессии генов к маркеру костного белка BGP (глутаминовый протеин, участвующий в процессах минерализации), измерением внеклеточных преципитатов солей кальция и фосфора.

Ключевые слова: клеточный носитель, поли-3-гидроксibuтират, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, дифференцировка, остеобласты.

Введение

К настоящему времени возможности улучшения результатов лечения патологии и травмы костной ткани только за счет традиционных хирургических методик соединения и лечения костных отломков практически исчерпаны. Актуальным становится поиск новых восстановительных технологий, направленных на устранение костных дефектов с использованием методов клеточной и тканевой инженерии (Деев и др., 2008).

После открытия А.Я. Фриденштейном мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) костного мозга человека они стали рассматриваться в качестве основного клеточного материала для обновления

и посттравматической регенерации костной ткани и естественного источника клеток для тканевой инженерии дефектов кости (Ярыгин, 2008).

Особенностью ММСК является высокая пролиферативная активность, клетки сохраняют нормальный кариотип и теломеразную активность при культивировании до 12-го пассажа (Zhang et al., 2007). Эффективность применения ММСК для восстановления переломов продемонстрирована на модельных животных (Bruder, 1999; Kruyt et al., 2004) и в немногочисленных клинических испытаниях (Schimming et al., 2004). В исследованиях отмечен существенный вклад ММСК в регенерацию костных дефектов как прогенератора

остеобластов, остеоцитов и клеточного пула; кроме того, ММСК способствуют формированию фиброзно-хрящевой костной мозоли в зоне дефекта (Yin et al., 2009; Yuan et al., 2010).

Перспективным источником получения ММСК помимо костного мозга является жировая ткань (ЖТ), клетки которой более доступны, их можно выделять в большем количестве и дифференцировать в остеогенном направлении, несмотря на возраст донора. Доказано, что ММСК жировой ткани имеют во многом сходный с ММСК костного мозга цитофенотипический профиль (Kern et al., 2006), обладают сравнимым потенциалом в отношении формирования костной ткани (Seo et al., 2004). В работе Cedola (Cedola et al., 2006) показано, что при использовании носителя из гидроксилатапата, имплантированного в костный дефект, образование кости *de novo* при использовании клеток ЖТ происходит раньше.

Установлено, что простое введение суспензии клеток в организм оказывается малоэффективным, поэтому возникает серьезная проблема поиска адекватного носителя для закрепления трансплантируемых клеток в организме реципиента. Поэтому выбор оптимального носителя для культуры остеогенных клеток служит одним из ключевых этапов создания тканеинженерного эквивалента костной ткани. Идеальный носитель должен удовлетворять следующим требованиям: 1) материал для конструирования носителей должен быть биосовместимым и биоразрушаемым, причем скорость его разрушения должна соответствовать скорости регенерации ткани; 2) носитель должен обладать взаимосвязанной пористостью, что необходимо для васкуляризации, увеличения потока кислорода и питательных веществ, а также оттока отходов; обладать еще и подходящей механи-

ческой прочностью; 3) поверхность носителя должна способствовать прикреплению, дифференцировке и делению клеток; 4) сам материал и продукты его биологического разрушения не должны вызывать отторжения и негативной реакции организма; 5) материал должен выдерживать процесс обработки для создания конструкций любой формы и размера (Pérez et al., 2012).

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэферы, продуцируемые микроорганизмами, имеют широкие перспективы применения в различных сферах, прежде всего в реконструктивной медицине (Шумилова и др., 2015; Шишацкая и др., 2008; Shishatskaya, 2006; Shishatskaya et al., 2014). Эти полимеры представляют большой интерес для клеточной и тканевой инженерии; способность П(ЗГБ), а также композитов П(ЗГБ) с биокерамикой поддерживать пролиферацию и направленную дифференцировку ММСК костного мозга в клетки остеобластического ряда продемонстрирована в ряде работ (Шишацкая и др., 2013; Qian et al., 2014). Доказано, что композиты П(ЗГБ)/*Bioglass* способствуют адгезии культуры клеток остеобластов MG-63 и формированию *in vivo* кальцийфосфатных образований (Misra et al., 2010). На примере высокопористых сополимерных матриц П(ЗГБ/ЗГВ) в композиции с икарином (активным флавоноидом) доказано, что они обладают высокой адгезионной способностью по отношению к остеобластоподобным клеткам человека линии MG-63, которые могут запускать механизмы остеогенеза (Leilei et al., 2013). Трехкомпонентные матрицы на основе П(ЗГБ/ЗГВ), шелка и наногидроксиапатита своей архитектурой имитируют волокнистый внеклеточный матрикс и способствуют пролиферации человеческих остеобластов с формированием клеточных преципитатов,

что подтверждает их биологическую активность (Pascu et al., 2013).

Цель настоящей работы – исследовать способность опорных клеточных носителей из ПГА поддерживать направленную дифференцировку ММСК из костного мозга и жировой ткани крыс в клетки остеобластического ряда и возможность их использования для конструирования клеточных графтов.

Материалы и методы

Макропористые объемные 3D-образцы из П(ЗГБ) получали с использованием техники выщелачивания. Для этого кусочки сахаразы ($1 \times 1 \times 1$ см) пропитывали раствором полимера в хлороформе, далее высушивали при температуре 30 °С. После испарения растворителя образцы промывали в дистиллированной воде до полного удаления сахаразы. Стерилизацию изделий проводили обработкой H_2O_2 -плазмой (плазменный стерилизатор Sterrad NX, «Johnson&Johnson», США), время стандартного цикла 47 мин, температура в цикле (46 ± 4) °С. Микроструктуру поверхности полимерных изделий исследовали с применением сканирующей электронной микроскопии (микроскоп HITACHI TM-3000, Япония).

Суммарную пористость и влагопоглощение матриц рассчитывали методом предельной адсорбции воды. Распределение пор по размерам в матриксе исследовали с использованием жидкостного экструзионного порозиметра (Liquid Extrusion Porosimeter LEP, PMI, США), физико-механические характеристики образцов регистрировали на универсальной электромеханической испытательной машине Instron 5565,5 KN (Великобритания).

Способность полимерных носителей поддерживать клеточную адгезию оценивали в первичной культуре ММСК крысы. Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки

костного мозга (ММСК-КМ) были получены из бедренных костей лабораторных крыс линии Вистар, умерщвленных передозировкой эфирным наркозом. Костный мозг выделяли в асептических условиях после удаления шейки кости; в открытый костномозговой канал с помощью шприца вводили 1 мл среды α -МЕМ с добавлением 20 % телячьей сыворотки и 50 ЕД гепарина, костный мозг вымывали и тщательно суспендировали, затем дважды центрифугировали и промывали питательной средой. Вторым источником ММСК служила жировая ткань (ММСК-ЖТ) крыс самок линии Вистар. Выделенную в стерильных условиях с области живота и бедер крыс жировую ткань измельчали до однородной массы, трехкратно промывали в физиологическом растворе, забуференном фосфатами (СФБ), содержащими антибиотики (100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). К полученной суспензии добавляли раствор коллагеназы I типа и инкубировали 60 мин в CO_2 -инкубаторе при 37 °С, встряхивая каждые 15 мин. Жировую ткань тщательно перемешивали до получения однородной суспензии, затем клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин. Удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в полной среде ДМЕМ. Суспензию клеток ММСК-КМ и ММСК-ЖТ переносили в чашки Петри диаметром 90 мм и помещали в CO_2 -инкубатор. Через 24 ч из обеих чашек среду вместе с не прикрепившимися клетками удаляли и заменяли свежей средой ДМЕМ. Для индукции дифференцировки ММСК-КМ и ММСК-ЖТ в остеобласты использована среда ДМЕМ с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки, раствора антибиотиков, 0,15 мМ аскорбиновой кислоты, 10 нМ дексаметазона и 10 мМ β -глицерофосфата. Клетки культивировали до монослоя, далее трижды пересеивали по стандартной методике с помощью 0,25%-го

раствора Трипсин-Версена для наращивания биомассы клеток.

Стерильные 3D-матрицы помещали в 24-луночные культуральные планшеты и проводили рассев клеток ММСК-КМ и ММСК-ЖТ из расчета 100 000 клеток на один матрикс с добавлением 1 мл среды. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор. Культивирование проводили в течение 21 суток при 37 °С с заменой среды каждые 3 дня.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Морфологию клеток, прикрепившихся к поверхности матриц, определяли с помощью флуоресцентной микроскопии (Leica DM 6000B, Германия) на препаратах, окрашенных флуоресцентными красителями DAPI и фаллоидином, конъюгированным с флуорохромом (FITC) (окраска ДНК и цитоплазмы соответственно). Распределение клеток и элементный состав преципитатов изучали с помощью электронной микроскопии. Для этого использовали растровый микроскоп HITACHI TM-3000 с системой микроанализа BRUKER XFlash 430 H (Япония) и рентгеноспектрального анализа (программа QUANTAX 70). Для подтверждения дифференцировки клеток в остеобластоподобные использовали один из биохимических маркеров формирования костной ткани – активность фермента костной щелочной фосфатазы, выделяемой остеобластами и предположительно участвующей в минерализации остеоидов. Щелочную фосфатазу оценивали с помощью набора Alkaline Phosphatase DetectionKit (Sigma, США) согласно протоколу производителя.

Для количественной оценки экспрессии генов к маркеру BGP (костный *gl**a*-протеин) применяли метод ПЦР, сопряженный с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) специфичной мРНК. Общую РНК выделяли из культур клеток на разных стадиях диффе-

ренцировки стандартным фенол-хлороформ-гуанидинизотиоционатным методом (при помощи набора реагентов «РНК-Экстрен» для выделения РНК из крови, тканей и культур клеток (Синтол, Россия)). Полученные данные обрабатывали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager 3.0.

Все анализы проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета прикладных программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Предпочтение при выборе имплантатов для остеопластики отдается изделиям пористой структуры. Пористые имплантаты обладают большей сорбционной способностью для притока субстратов и отведения продуктов обмена клеток в формирующихся тканях, большей площадью поверхности и совокупного объема, что положительно влияет на эффективность остеоинтегративных процессов и костеобразование.

Для получения пористых 3D-имплантатов из П(ЗГБ) использовали технику выщелачивания. Внешний вид и микроструктура полученных пористых 3D-имплантатов показаны на рис. 1.

На основании проведенного с использованием жидкостного экструзионного порозиметра морфологического анализа в объеме полимерного носителя, помимо основных крупных пор, выявлены более мелкие поры, соединяющие между собой полимерные ячейки и обеспечивающие единое пространство. Суммарный объем всех выделенных пор исследуемых 3D-носителей был около 87,3 %, при этом крупные поры диаметром 110–120 мкм составляли до 90 %; остальные 10 % приходились на мелкие поры (5,7–10 мкм). Результаты компьютерного анализа со-

гласуются с экспериментальными данными по определению суммарного объема пор по влагоемкости (88 %). Влагопоглощение полимерного носителя 2,6 см³/г. Модуль Юнга матриц 3,23 МПа, напряжение 0,20 МПа, деформация 27,7 %.

Исследование остеогенного потенциала ММСК из КМ и ЖТ показало различную степень активности культивируемых клеток на полимерных носителях. По результатам МТТ-теста достоверные отличия в количестве жизнеспособных остеобластов на пористых матрицах П(ЗГБ) были зарегистрированы уже на 7-е сутки культивирования, $1,0 \times 10^5$ кл/см² и $1,3 \times 10^5$ кл/см² для дифференцированных ММСК-КМ и ММСК-ЖТ соответственно (табл. 1). На 21-й день культивирования максимальное количество клеток зарегистрировано на носителях, засеянных

ММСК-ЖТ ($2,05 \times 10^5$ кл/см²). Это в 1,3 раза больше, чем на носителях с ММСК-КМ. Результаты МТТ-теста согласуются с измерением активности щелочной фосфатазы: более высокие значения активности фермента получены для культуры остеобластов из ММСК-ЖТ ($3,70$ моль/мин $\times 10^5$ клеток на 21-е сутки). Для клеток из ММСК-КМ показатель был ниже ($2,57$ моль/мин $\times 10^5$ клеток) (табл. 1).

На рис. 2 представлены РЭМ-снимки клеток, продуцирующих внеклеточные преципитаты солей кальция и фосфатов, элементный состав преципитатов показан в табл. 2. На 21-е сутки культивирования на поверхности носителя с дифференцированными ММСК-КМ отмечено небольшое количество клеток, располагающихся преимущественно в колониях. На поверхности носителя с дифференцированными остеобла-

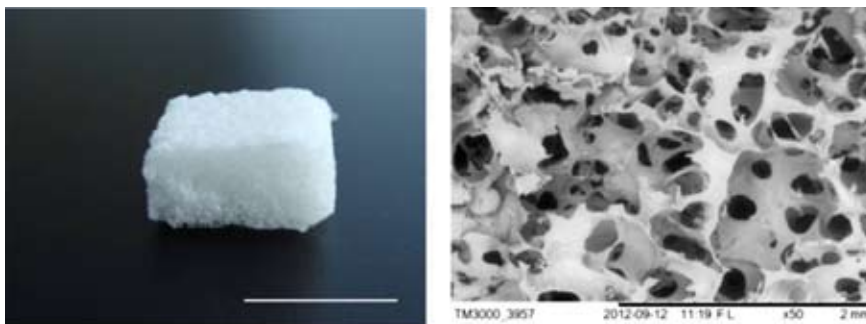


Рис. 1. Макрофото (слева, маркер 1 см) и РЭМ-изображение (справа, маркер 2 мм) макропористых 3D-имплантатов из П(ЗГБ), полученных техникой выщелачивания

Таблица 1. Количество жизнеспособных клеток по результатам МТТ-теста (МТТ) и активность щелочной фосфатазы остеобластов (ЩФ), дифференцированных из ММСК костного мозга и жировой ткани и культивируемых на полимерных пористых 3D-носителях из П(ЗГБ) (среднее \pm стандартная ошибка, n=5)

Сутки	МТТ (10^5 кл/см ²)		ЩФ (моль/мин $\times 10^5$ клеток)	
	ММСК-КМ	ММСК-ЖТ	ММСК-КМ	ММСК-ЖТ
3	$0,94 \pm 0,07$	$0,97 \pm 0,11$	-	-
7	$1,01 \pm 0,11$	$1,30 \pm 0,12$	$0,65 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,05$
14	$1,24 \pm 0,08$	$1,66 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,03$	$1,26 \pm 0,11$
21	$1,66 \pm 0,13$	$2,05 \pm 0,11$	$2,57 \pm 0,03$	$3,70 \pm 0,03$

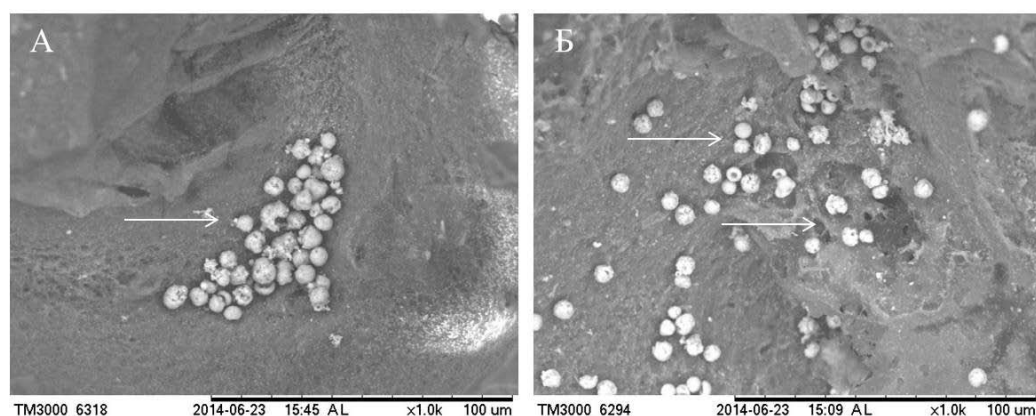


Рис. 2. РЭМ-снимки остеобластов, полученных из ММСК костного мозга (А) и жировой ткани (Б), культивируемых на пористых 3D-носителях из П(ЗГБ) (21-е сутки). Маркер 100 мкм. Стрелками указаны скопления клеток

Таблица 2. Результаты спектрального анализа минеральных преципитатов, продуцируемых остеобластами, полученными из ММСК костного мозга и жировой ткани при культивировании на 3D-носителях из П(ЗГБ) (по результатам РЭМ, программа QUANTAX 70) (среднее±стандартная ошибка, n=3)

Источник остеобластов	Содержание элементов, % по массе			
	С	О	Са	Р
3-и сутки				
ММСК-КМ	56,7 ± 1,20	42,4 ± 0,21	0,7 ± 0,30	0,2 ± 0,10
ММСК-ЖТ	55,2 ± 0,37	44,3 ± 0,16	2,3 ± 0,12	1,1 ± 0,34
7-е сутки				
ММСК-КМ	53,4 ± 1,07	44,3 ± 0,79	1,2 ± 0,50	1,0 ± 0,17
ММСК-ЖТ	46,9 ± 1,12	43,1 ± 1,01	6,5 ± 1,07	3,4 ± 0,45
14-е сутки				
ММСК-КМ	46,1 ± 0,45	38,8 ± 0,20	6,0 ± 0,79	3,6 ± 1,52
ММСК-ЖТ	44,6 ± 0,12	39,8 ± 0,31	10,4 ± 1,65	5,0 ± 1,68
21-е сутки				
ММСК-КМ	46,7 ± 1,40	43,7 ± 0,12	9,7 ± 1,72	5,2 ± 1,08
ММСК-ЖТ	48,6 ± 1,10	30,8 ± 0,15	15,8 ± 1,10	6,8 ± 1,63

стами из ММСК-ЖТ отмечены многочисленные скопления клеток, локализованных как на поверхности, так и в порах полимерного матрикса. Окрашивание остеобластов, дифференцированных из разных источников, культивируемых на пористых 3D-носителях, наглядно показало существенно большее количество клеток из ММСК жировой ткани (рис. 3).

Остеогенная дифференцировка ММСК-КМ и ММСК-ЖТ в остеобласты дополнительно подтверждена количественной оценкой экспрессии генов к маркеру *BGP* (костный *gla*-белок) (табл. 3). *BGP* – костный глутаминовый протеин (остеокальцин) – небольшой белок, который наиболее широко представлен в костном матриксе. На 7-е сутки уровень продукции *BGP* клетками, дифференциро-

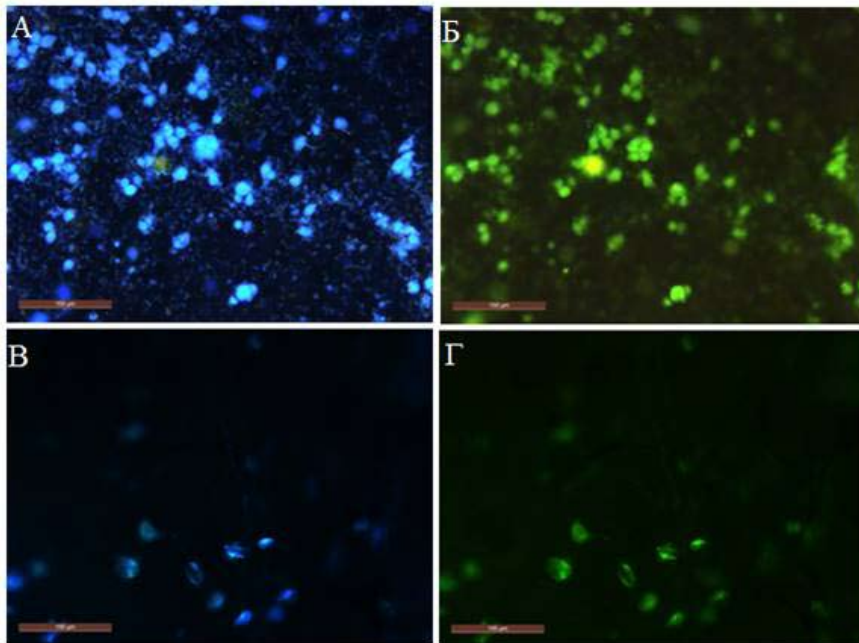


Рис. 3. Окрашивание флуоресцентными красителями DAPI и FITC ядерной ДНК и цитоплазмы ММСК жировой ткани (А и Б) и костного мозга (В и Г), дифференцированных в клетки остеобластического ряда, на пористых 3D-носителях из П(ЗГБ) (21-е сутки). Маркер 100 мкм

Таблица 3. Количество копий кДНК, кодирующей BGP белок костной ткани у остеобластов, дифференцированных из клеток ММСК костного мозга и жировой ткани (среднее±стандартная ошибка, n=3)

Сутки	Количество копий кДНК BGP (тыс.)	
	ММСК-КМ	ММСК-ЖТ
3	200 ± 1,25	263 ± 1,01
7	478 ± 1,17	435 ± 1,12
14	753 ± 1,15	961 ± 1,23
21	878 ± 1,30	1258 ± 1,40

ванными в остеобласты из ММСК-КМ, был выше, чем у клеток из ММСК-ЖТ. Однако к концу эксперимента (21-е сутки) соотношение изменилось: уровень экспрессии у клеток из ММСК-КМ стал значительно ниже по сравнению с дифференцированными клетками из ММСК-ЖТ.

Выполненные сравнительные исследования показали, что из ММСК жировой ткани в остеобласты дифференцируется большее

количество клеток при более высокой активности в них щелочной фосфатазы, а также продукции внеклеточных преципитатов солей кальция и фосфора. Поэтому для конструирования с использованием П(ЗГБ) тканеинженерных графтов, предназначенных для восстановления дефектов костной ткани, предпочтение в качестве источника остеобластов следует отдать клеткам ММСК жировой ткани.

Заключение

Проведено исследование ПГА в качестве опорных клеточных носителей (скаффолдов) в культуре мультипотентных мезенхимных стволовых клеток жировой ткани и костного мозга. Доказаны высокие адгезионные свойства полимерных носителей и способность поддерживать пролифе-

рацию и направленную дифференцировку клеток в остеобласты. Результаты молекулярных, биохимических и морфологических исследований показали, что наиболее высоким потенциалом в качестве источника остеобластов обладают ММСК жировой ткани. Сконструированы тканеинженерные конструкции (графты).

Работа выполнена за счет средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № гос. регистрации 01201351505).

Список литературы

Деев Р.В., Исаев А.А., Кочиш А.Ю., Тихилов Р.М. (2008) Пути развития клеточных технологий в костной хирургии. *Травматология и ортопедия России*, 1: 65-74 [Deev R.V., Isaev A.A., Kocsis A.Y., Tikhilov R.M. (2008) The ways of development of cellular technology in bone surgery. *Traumatology and orthopedics of Russia* [Травматологиya i ortopediya Rossii], 1: 65-74 (in Russian)]

Шишацкая Е.И., Маркелова Н.М., Винник Ю.С., Гавриленко Е.С., Кузнецов М.Н., Белецкий И.И. (2008) Формирование кишечного анастомоза с помощью нового рассасывающегося шовного материала на основе линейного полиэфира 3-гидроксимасляной кислоты в эксперименте. *Здоровье и образование в XXI веке*, 10: 345-346 [Shishatskaya E.I., Markelov N.M., Vinnik Y.S., Gavrilenko E.S., Kuznetsov M.N., Beletsky I.I. (2008) Experimental formation of intestinal anastomosis using new absorbable suture material based on linear polyester of 3-hydroxybutyric acid. *Health and Education in the 21st century* [Zdorove i obrazovanie v XXI veke], 10: 345-346 (in Russian)]

Шишацкая Е.И., Николаева Е.Д., Шумилова А.А., Шабанов А.В., Волова Т.Г. (2013) Культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на носителях из резорбируемого Биопластотана. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 1: 57-65 [Shishatskaya E.I., Nikolaeva E.L., Shumilova A.A., Shabanov A.V., Volova T.G. (2013) The culture of multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells on the carriers of resorbable Bioplastotan. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering* [Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya], 1: 57-65 (in Russian)]

Шумилова А.А., Шишацкая Е.И., Маркелова Н.М., Винник Ю.С., Зуев А.П., Кириченко А.К., Соловьева Н.С. (2015) Остеопластические свойства макропористых имплантатов на основе поли-3-гидроксibuтирата в регенерации костного дефекта трубчатой кости кролика. *Фундаментальные исследования*, 7: 697-706 [Shumilova A.A., Shishatskaya E.I., Markelova N.M., Winnick Y.S., Zuev A.P., Kirichenko A.K., Solovieva N.S. (2015) Osteoplastic properties of macroporous implant of poly-3-hydroxybutyrate in the regeneration of the cortical bone defect of rabbit. *Basic research* [Fundamentalnye issledovaniya], 7: 697-706 (in Russian)]

Ярыгин К.Н. (2008) Роль циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, 1: 2-8 [Yarygin K.N. (2008) The role of circulating stem cells in physiological and reparative regeneration. *Pathological*

Physiology and Experimental Therapy [Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya], 1: 2-8 (in Russian)]

Bruder S.P. (1999) Tissue engineering of bone cell based strategies. *Clinical Orthopedics and Related Research*, 367: 68-83

Cedola A., Mastrogiacomo M., Burghammer M. (2006) Engineered bone from bone marrow stromal cells: a structural study by an advanced x-ray microdiffraction technique. *Physics in Medicine and Biology*, 51: 109-116

Kern S., Eichler H., Stoeve J. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose. *Stem Cells*, 24: 1294-1301

Kruyt M.C., Dhert W.J., Yuan H. (2004) Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. *Journal of Orthopaedic Research*, 22: 544-551

Leilei X., Yongsheng L., Zhou Z. (2013) Icariin delivery porous PHBV scaffolds for promoting osteoblast expansion *in vitro*. *Materials Science and Engineering: A*, 33: 3545-3552

Misra S., Ansari T., Valappil S. (2010) Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 31: 2806-2815

Paşcu E.I., Stokes J., McGuinness G.B. (2013) Electrospun composites of PHBV, silk fibroin and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: A*, 33: 4905-4916

Pérez A., Won J., Knowles J. (2012) Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65: 471-496

Qian C., Zhang J., Haitao L. (2014) The mechanism of anti-osteoporosis effects of 3-hydroxybutyrate and derivatives under simulated microgravity. *Biomaterials*, 35: 8273-8283

Seo B.M., Miura M., Gronthos S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364: 149-155

Schimming R., Schmelzeisen R. (2004) Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *Surgeon*, 62: 724-729

Shishatskaya E.I. (2006) Biocompatible and functional properties of a poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite hybrid composite. *Bulletin of transplantation of artificial organs*, 3: 34-38

Shishatskaya E.I. Kamendov I.V., Starosvetsky S.I., Vinnik Y.S., Markelova N.M. Shageev A.A., Khorzhevsky V.A., Peryanova O.V., Shumilova A.A. (2014) An *in vivo* study of osteoplastic properties of resorbable poly-3-hydroxybutyrate in models of segmental osteotomy and chronic osteomyelitis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 40: 344-355

Yin D., Wang Z., Gao Q., Sundaresan R., Parrish C., Yang Q., Krebsbach P.H., Lichtler A.C., Rowe D.W., Hock J., Liu P. (2009) Determination of the fate and contribution of *ex vivo* expanded human bone marrow stem and progenitor cells for bone formation. *Molecular Therapy*, 17: 1967-1978

Yuan J., Zhang W.J., Liu G., Wei M., Qi Z.L., Liu W., Cui L., Cao Y.L. (2010) Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and coral. *Tissue Engineering Part A*, 16: 1385-1394

Zhang Z.X., Guan L.X., Zhang K., Wang S.X., Cao P.C., Wang Y.H., Wang Z., Dai L.J. (2007) Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged *in vitro*. *Cell Biology International*, 31: 645-648