

ОБЗОР ЛОКАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОЦЕССОВ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ, ИНДУЦИРОВАННЫХ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫМИ МАТЕРИАЛАМИ

© 2023 г. Л. А. Мирошниченко¹, Т. Ю. Полякова², Л. С. Литвинова¹ *, И. А. Хлусов¹

¹Лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

²Кафедра нормальной физиологии, Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

*E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 01.08.2023 г.

Принята к публикации 04.08.2023 г.

Одной из ведущих причин госпитализации, инвалидизации и смертности 50% женщин и 20% мужчин в возрастной группе старше 50 лет являются переломы костей и их осложнения, обусловленные заболеваниями опорно-двигательной системы. Активный поиск решения проблемы, связанной с ограничениями применения в клинике ауто-, алло- и ксенотрансплантатов, для замещения костных дефектов, инициировал развитие регенеративного подхода, основанного на постепенном замещении искусственного материала растущей костной тканью. Перспективными в этом отношении являются материалы на основе фосфатов кальция, выполняющие роль активного источника химических элементов (кальций, фосфор и др.), способные оптимизировать процесс сращения костного дефекта и обеспечить замену имплантата новой костной тканью. В представленном обзоре обобщены данные из литературы о локальной биологической активности, клетках-мишенях и молекулярных эффектах фосфатов кальция. Показано, что кальцийфосфатные материалы биосовместимы, способны адсорбировать регуляторные белки и клетки, оказывая влияние на их генетический и секреторный аппарат и запуская процесс дифференцировки МСК в остеогенном направлении. При этом успешная реализация локальных механизмов остеоинтеграции на границе раздела кость–имплантат снижает риск перипротезной инфекции и отторжения искусственных изделий. Дальнейшее изучение и использование кальцийфосфатных материалов позволит осуществить значительный прорыв в решении современных проблем регенерации костной ткани, связанный с точным (цифровым) биоинженерным подходом на основе аддитивных технологий и искусственного интеллекта.

Ключевые слова: кальцийфосфатные материалы, остеоиндукция, остеогенные клетки, остеогенез, регенерация, мезенхимные стволовые клетки, клеточно-молекулярные механизмы

DOI: 10.31857/S0041377123060068, EDN: QNYLGA

Переломы костей и их осложнения (несращение, ложные суставы, остеомиелит и др.) (Ekegren et al., 2018), а также заболевания (остеонекроз, остеопороз и др.) (Miller, 2016; Zhao et al., 2018) являются одной из ведущих причин госпитализации, инвалидизации и смертности населения во всем мире. Так, 70% людей в возрастной группе от 50 лет и старше рискуют получить переломы, обусловленные остеопорозом (Coughlan, Dockery, 2014).

Принятые сокращения: BMP – морфогенетический белок кости; МСК – мезенхимная стволовая клетка; СККМ – стромальные клетки костного мозга; СаР – кальцийфосфат; НАР – гидроксиапатит; М-CSF (CSF1) – макрофагальный колониестимулирующий фактор; MNGC – многоядерная гигантская клетка; РКС – протеинкиназа С; Pi – фосфатная группа (неорганический фосфор); PPI – пирофосфат; RANK – рецептор-активатор NF-κB; RANKL – лиганд RANK; β-TCP (TCP) – β-трикальцийфосфат; TGF-β – трансформирующий фактор роста β.

Большую проблему составляют крупные (более 2.5 см) костные дефекты (Schemitsch, 2017), которые часто формируются после травм и заболеваний костей (включая онкологические), не могут регенерировать посредством биологических механизмов (El-Rashidy et al., 2017) и требуют хирургического лечения. Активный поиск решения проблем, связанных с применением ауто-трансплантатов (золотой стандарт лечения, но малый объем кости, двойная травматизация), алло- и ксенотрансплантатов (риск переноса инфекций, иммунологический конфликт, слабый остеогенез) (Karalashvili et al., 2018), деминерализованного костного матрикса (неэффективен по некоторым сообщениям (Campana et al., 2014)) для замещения костных дефектов, инициировал развитие альтернативных методов и материалов для тканевой инженерии (Thrivikraman et al., 2017). Существуют надежды если не на сокращение сроков

терапии, то на оптимизацию и контроль за процессом лечения по сравнению с использованием традиционных трансплантатов (Корель, Кузнецов, 2019).

В настоящее время актуальным становится регенеративный подход к лечению повреждений и заболеваний костной ткани, основанный на постепенном замещении искусственного материала растущей костной тканью. Биоматериал, выполняющий роль активного источника химических элементов (кальций, фосфор и др.), необходимых для построения костной ткани, должен оптимизировать процесс сращения костного дефекта за счет резорбции и замены имплантата новой костной тканью. Понятными и наиболее изученными свойствами в этом отношении обладают материалы на основе фосфатов кальция (Liu et al., 2022).

По ключевому словосочетанию “calcium phosphate materials for bone” поисковая система Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) показала прирост публикаций от одной в 1976 г. до ежегодных 321–360 статей в 2013–2021 гг. Однако несмотря на многообразие исследований и разработок в области кальцийфосфатных (СаР) материалов и покрытий, до сих пор биологические механизмы их остеоинтеграции мало понятны (Xiao et al., 2020); клиническое применение носит консервативный характер (Jeong et al., 2019), в основном в области цементов для заполнения костных дефектов (Thrivikraman et al., 2017).

Существует локальное и дистантное (через регуляторные системы организма) влияние имплантируемых материалов и изделий на органы-мишени (Ratner et al., 2004).

В настоящем обзоре обобщены данные из литературы о локальной биологической активности, клетках-мишенях и молекулярных эффектах фосфатов кальция, применяемых для стимуляции репаративной регенерации костной ткани.

КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

В настоящее время синтетические СаР-материалы и покрытия, благодаря своему физико-химическому подобию минеральному матриксу природной костной ткани, активно применяются в биомедицине (одни или в составе композитов) для замещения дефектов, лечения повреждений и заболеваний опорно-двигательного аппарата (Kim, Park, 2020), в том числе при сниженном потенциале к репарации кости. Синтезированная керамика, в основном, состоит из спеченных СаР, включающих трикальцийфосфат (ТСР или β -ТСР), гидроксиапатит (НАР) или двухфазный СаР (НАР и β -ТСР кальцийфосфат), а также аморфный СаР (Samavedi et al., 2013). Активное изучение фосфатов кальция в качестве биоматериалов для трансплантации началось с 1900-х годов прошлого столетия. Первые попытки их использования для заполнения костных дефектов у кроли-

ков были предприняты в первой половине XX века (Albee, 1920).

СаР-керамика относится к классу перестраиваемых биоактивных материалов, способных образовывать связи с окружающими тканями и проявлять остеокондуктивность (свойство образования костной ткани на поверхности или в объеме материала за счет усиления кондукции остеогенных клеток и реваскуляризации) и (или) остеоиндуктивность (способность материала и/или его компонентов стимулировать дифференцировку стволовых клеток в хондроциты и остеобласты) (Fillingham, Jacobs, 2014). Однако не все типы СаР-керамики обладают одинаковым биологическим действием (Ghosh et al., 2008); большинство из них являются остеокондуктивными, и только некоторые типы способны к остеоиндукции (Jeong et al., 2019).

Различия связаны с особенностями физико-химических и структурных параметров СаР-керамики. Многочисленные исследования позволили сформировать ряд типов СаР-керамики по остеоиндуктивному потенциалу в присутствии остеогенных добавок (аскорбиновой кислоты, дексаметазона, глицерофосфата): ТСР > двухфазный СаР \approx НАР > аморфный СаР (Yuan et al., 2010), а также при их отсутствии: двухфазный СаР > ТСР > НАР (Polini et al., 2011). Эти различия в рядах остеоиндуктивности предполагают, что физико-химические свойства СаР-керамики могут значительно влиять на остеоиндукцию; кроме того, двухфазные СаР, которые сочетают свойства как НАР, так и ТСР, могут обладать более высокой остеоиндуктивностью, чем чистые НАР или ТСР.

Остеорепаративная функция СаР обусловлена не только биосовместимостью, но и биоразлагаемостью (Ben-Nissan, 2014). В этом плане пришло понимание, что аморфные СаР, вследствие своей высокой растворимости и способности трансформироваться в октакальцийфосфат, могут не только вызывать периимплантационное воспаление (Edwards et al., 2011), но и способствовать остеоиндукции *in vitro* (Litvinova et al., 2020) и *in vivo* (Komarova et al., 2020).

В организме биологически активные материалы из СаР-керамики претерпевают биотрансформацию: растворение (клеточную резорбцию), ионный обмен и осаждение минеральной фазы (Mao et al., 2015). Как следствие, формируется слой карбонатного гидроксиапатита как триггер образования новой минерализованной кости (Daculsi et al., 1989) на границе раздела, что приводит к химическому и биологическому соединению материала имплантата с костной тканью (Добринская, 2018). Апатитовый слой растет в виде поликристаллических агломератов, в состав которых включаются эндогенные белки костного матрикса, способствующие прикреплению и росту стволовых и остеогенных клеток. Эти клетки продуцируют костный внеклеточный матрикс, обеспечивающий биоминерализацию – связывание неорганической поверхности имплантата с органиче-

скими компонентами тканей (Du et al., 2000). Таким образом, граница раздела между биоактивным имплантатом и костью при ее ремоделировании почти идентична естественно возникающим границам раздела между остеонами.

После имплантации растворимость СаР приводит к локальному увеличению концентрации ионов кальция и фосфата, а также изменению уровня рН (Ben-Nissan et al., 2014), влияющего на адгезию белков (Jeong et al., 2019). Растворимость фосфатов кальция снижается в следующем порядке: аморфный СаР > ТСР > двухфазный СаР > НАР и зависит от соотношения Са/Р (более низкое соотношение характеризуется более высокой кислотностью и растворимостью фосфатов кальция) и значений рН среды. Среди СаР стехиометрический НАР (Са/Р = 1.67) является наиболее стабильным и наименее растворимым в водной среде (Samavedi et al., 2013).

Согласно существующим данным, костный минерал первоначально образуется за счет спонтанного осаждения ионов кальция и фосфата с образованием кристаллов НАР в матриксных везикулах остеобластов, которые затем попадают во внеклеточную жидкость, способствуя дальнейшей кристаллизации. Этот процесс негативно регулируется пирофосфатом (PPi), который образуется как внутри-, так и вне клеток, поскольку избыток PPi приводит к снижению минерализации костей, а дефицит — к избыточному образованию минералов (Sarıg-Kögen, Livshits, 2011). В свою очередь, щелочная фосфатаза во внеклеточных везикулах высвобождает фосфатные группы (Pi) из пирофосфата, которые, напротив, стимулируют кальцификацию тканей. Таким образом, соотношение Pi/PPi является недавно установленным молекулярным механизмом, модулирующим минерализацию костного матрикса (Murshed, 2018).

Известно, что гомеостаз фосфатов контролирует гликопротеин 1 плазматических клеток, кодируемый геном эктонуклеотидной пирофосфатазы/фосфодиэстеразы 1 (ENPP1), который активируется для подавления дальнейшей минерализации в ответ на экспрессию высоких уровней белка кости BMP-2 и начало минерализации (Goding et al., 2003). Однако исследования показали, что экспрессия гликопротеина 1 ограничена теми клетками, которые находятся в непосредственном контакте с остеиндуктивной СаР поверхностью. Вероятно, это обусловлено локальным истощением ионов кальция и неорганического фосфата в пересыщенной среде вследствие обратного осаждения и кристаллизации СаР на искусственном материале (Böhner, Miron, 2018; Othman et al., 2019).

Клетки, находящиеся в прямом контакте с таким материалом, первыми дифференцируются в остеогенном направлении (Othman et al., 2019). Остеокласты, образующиеся из предшественников моноцитарного ряда, уменьшают значение рН до 5 за счет протонирования межклеточной среды (Humbert et al.,

2019), секретируют катепсин К и матриксные металлопротеиназы, что, в дополнение к химическому растворению, приводит к резорбции СаР-керамики и высвобождению ионов Са и фосфата (Ripamonti, Roden, 2010). В связи с вариабельной растворимостью СаР-материалов и покрытий, существует их прямое (за счет структуры объема и/или поверхности) и непрямое (посредством ионного обмена) влияние на их деградацию (Bianchi et al., 2014), а также на костную ткань и ее компоненты (Khlusov, et al., 2018).

НЕПРЯМОЕ ВЛИЯНИЕ СаР НА ОСТЕОГЕННЫЕ КЛЕТКИ, ОСТЕОИНДУКТИВНЫЕ ГЕНЫ, СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ И БЕЛКИ

Ионы кальция и фосфата влияют на регенерацию костей посредством внутриклеточной передачи сигналов (Jeong et al., 2019). Так, согласно данным из литературы (Jung et al., 2010), внеклеточный кальций, полученный в результате растворения НАР, связываясь с кальций-чувствительными рецепторами, через кальциевые каналы активирует путь СаМК2 α /CAM, который в свою очередь модулирует дифференцировку остеобластов через белок CREB и (или) путь ERK1/2 (Zayzafoon et al., 2005). Подтверждена также роль Са²⁺ и в активации классического MAP-киназного пути (Liu et al., 2008).

Ионы кальция и фосфата способствуют экспрессии маркеров дифференцировки и созревания остеобластов, таких как коллаген I типа, щелочная фосфатаза (ALP), морфогенетические белки кости (BMP), остеопонтин, остеокальцин, костный сиалопротеин, фактор транскрипции RUNX2 (Orimo, 2010). Например, в независимой работе (Barradas et al., 2012) показано, что повышение уровня Са²⁺ в межклеточной среде увеличивает экспрессию мРНК гена *BMP-2* в стромальных клетках костного мозга (СККМ) человека в отсутствие остеогенных добавок, предположительно за счет активации протеинкиназы С (PKC) и ERK1/2-зависимого пути, в результате чего димер c-FOS–c-JUN может связываться с доменом AP-1 в промоторной области гена *BMP-2*. При этом увеличение концентрации Са²⁺ вне клетки способствует внутриклеточному выбросу его из органелл (Majidinia et al., 2018). Одним из тонких регуляторных механизмов этого процесса могут быть Са²⁺-активируемые калиевые каналы цитоплазматической мембраны, которые способствуют внутриклеточному повышению концентрации Са²⁺, гиперполяризации мембраны и инициации дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) (Pchelintseva, Djamgoz, 2018).

Существует предположение, что минерализация и регуляция скорости роста кристаллов минеральной фазы может инициироваться белками (Bellows et al., 1991). Так, различные неколлагеновые белки, связанные с подложкой ковалентными связями, могут

способствовать минерализации (Добринская, 2018). В то же время в зависимости от внешних факторов подобные протеины могут как инициировать, так и блокировать процессы минерализации (Nudelman et al., 2010). Известно, что макромолекулы, подавляющие рост кристаллов в растворе, могут быть подложкой для ориентированной нуклеации новой минеральной фазы (Flade et al., 2001). Кроме того, адсорбция протеинов может понижать поверхностную энергию на границе керамика–жидкость и, тем самым, снижать способность поверхности к минеральной нуклеации, а также тормозить процессы минерализации вследствие адсорбции белков на центрах выделения новой кристаллической фазы (Combes, Ray, 2002).

Ряд исследователей указывают на участие ионов Ca^{2+} в секреции про- и противовоспалительных цитокинов (Litvinova et al., 2020) с остеомодулирующим потенциалом (Yugova et al., 2021), в стимуляции зрелых костных клеток за счет образования оксида азота (Foreman et al., 2005), увеличении продолжительности жизни остеобластов через активацию пути PI3K/Akt (Danciu et al., 2003), а также в дифференцировке остеокластов и регулировании их резорбтивной активности (Kuroda et al., 2008).

Кроме того, ионизированный кальций, высвобождающийся из CaP-материалов, индуцирует остеогенную дифференцировку МСК и клеточных линий остеобластов (Viti et al., 2016). При этом отмечен (эпигенетический эффект в отношении экспрессии генов остеогенной дифференцировки, например, *RUNX2*, *BMP-6*, *ALPL* (Litvinova et al., 2020), *SMAD* и *RAS* (Viti et al., 2016).

В настоящее время активно изучаются многочисленные сигнальные пути и регуляторные сигналы (микроРНК, молчащие РНК и т.п.), участвующие в (эпигенетическом контроле остеобластов и остеокластов (Vulf et al., 2022). Дифференцировка МСК в остеобласты представляет собой сложное взаимодействие между паракринными и аутокринными сигналами, которые запускают несколько клеточных и молекулярных механизмов, способствующих активации двух транскрипционных факторов – *RUNX2* и нижестоящего *Osterix* (Garg et al., 2017). *RUNX2* активируется посредством многих сигнальных путей, включая белки BMP и трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (James, 2013). BMP участвуют в дифференцировке МСК и (или) остеобластов в сторону хондроцитов и остеобластов (Garg et al., 2017). BMP-2, -4, -6, -7 и -9 активируют остеобластогенез, тогда как BMP-3 и BMP-13 действуют как ингибиторы остеогенной дифференцировки (Shen et al., 2009). TGF- $\beta 1$ способствует образованию остеокластов из стимулированных предшественников RANK, но снижает экспрессию RANKL в остеобластах (Quinn et al., 2001).

Тем не менее, расшифровка конкретных молекулярных механизмов и их взаимодействия после имплантации CaP-материалов еще впереди. Роли фос-

фатов в костной минерализации и остеогенезе в литературе уделяется гораздо меньшее внимание. Считается, что при первичной минерализации ионы фосфата и кальция поступают в везикулы на наружной стороне мембраны остеобластов через мембранные переносчики и ферменты. Накопление Ca^{2+} и PO_4^{3-} в пузырьках матрикса вызывает зарождение и рост кристаллов из малорастворимых фосфатов кальция. Кристаллы фосфатов кальция образуются радиально внутри пузырька, проникают через его мембрану и продолжают расти за его пределами, в конечном итоге образуя минерализованные узелки. Затем растущие минерализованные узелки пропитывают коллагеновые фибриллы. После этого минеральная плотность костей постепенно увеличивается в процессе вторичной минерализации. Механизмы этого явления остаются неясными, но ключевую роль могут играть остециты; предполагается, что остециты обеспечивают транспорт Ca^{2+} и PO_4^{3-} через каналцы сети остеоцитов, а также регулируют минерализацию окружающего костного матрикса (Hasegawa et al., 2022).

Повышение содержания свободного фосфата в культуральной среде приводит к увеличению уровня РНК остеопонтина в клетках преостеобластов MC3T3-E1 за счет активации ERK1/2- и PKC-зависимых путей (Julien et al., 2009). Выявлена дозозависимая активация BMP-2 в клетках, происходящих из надкостницы человека, в ответ на лечение ионами фосфата отдельно или в сочетании с кальцием (Chai et al., 2011). Авторы предположили участие этих ионов в активации аутокринных/паракринных сигнальных механизмов, участвующих в дифференцировке клеток.

В другой работе продемонстрировали, что ионы кальция в растворе способствуют адсорбции BMP-2 на поверхности HA, в то время как ионы фосфата, по-видимому, ингибируют этот процесс (Voix et al., 2005). В то же время ионизированный неорганический фосфор (Pi) увеличивал экспрессию *BMP-2* на уровне мРНК и белка, а также активность промотора *BMP-2*, действуя через сигнальные каскады cAMP/PKA и ERK1/2 в клетках пульпы зуба человека (Tada et al., 2011).

Другие авторы (Khoshniat et al., 2011) выяснили, что для активации ERK1/2-зависимого пути для Pi необходим Ca^{2+} . Рядом исследователей показано, что фосфат по принципу отрицательной обратной связи между RANK-лигандом и сигналом его рецептора регулирует соотношение RANK-лиганд/остеопротегерин для ингибирования процессов дифференцировки остеокластов и резорбции кости (Zhang et al., 2011). Введение кроликам ионов Ca^{2+} и фосфата в концентрации 1.8 и 0.09 мМ соответственно способствовало пролиферации и дифференцировке СККМ (Liu et al., 2009). Более высокие концентрации фосфата не влияли на дифференцировку клеток, но вызывали их гибель. Напротив, более высокие концентрации

Ca^{2+} ингибировали дифференцировку клеток (о чем свидетельствует снижение секреции щелочной фосфатазы и экспрессии мРНК коллагена I типа/остеокальцина), но способствовали минерализации матрикса (Samavedi et al., 2013). Получены данные о том, что истощение ионов кальция и (или) фосфата в центре имплантируемого материала может индуцировать формирование кости за счет восприятия кальция иммунными и костными клетками (Böhner, Miron, 2018). Напротив, повышенное содержание ионов кальция и фосфата в межклеточной среде может негативно влиять на прикрепление остеобластов (Meleti et al., 2000).

ПРЯМОЕ ОСТЕОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Фосфаты кальция, сформированные в виде объемных материалов или покрытий, играют важную роль в адгезии клеток и формировании тканей, в том числе влияя на адсорбцию белков внеклеточного матрикса на поверхности (Vulnheim, et al., 2012). Адсорбция белка представляет собой сложный процесс, обусловленный термодинамическими и кинетическими изменениями, которые зависят от состояния поверхности биоматериала, ионного окружения и структурных (химических) свойств белка (Tsapikouni, Missirlis, 2008).

Остеоиндуктивные белки, в том числе BMP, и фактор роста TGF- β , обладают высоким сродством к фосфатам кальция (Barradas et al., 2011). С точки зрения химии поверхности CaP-материалов, TSP связывает больше белков, чем NAP. В свою очередь экспрессия генов, кодирующих остеогенные пептиды и факторы дифференцировки (остеокальцин, костный сиалопротеин, остеопонтин и RUNX2) в МСК, имплантированных на NAP, была ниже, чем на β -TSP, что связано по мнению авторов с 10–15-кратным увеличением удельной площади поверхности (микропористости) TSP и высвобождением кальция (Yuan et al., 2010).

В принципе, аффинность BMP к нестехиометрическим CaP (например, кремний-замещенному NAP) примерно в 1.5–2 раза выше по сравнению с чистым (без добавок) NAP (Mafina et al., 2017). Этот феномен может быть одним из молекулярных механизмов повышенной остеогенной описанной активности силиконированных CaP-материалов и покрытий (например: Пичугин и др., 2011).

Адсорбируемые клеточно-адгезивные белки (фибронектин, коллаген, витронектин) межклеточного матрикса играют важную роль в клеточной адгезии, опосредованной интегринами на клеточных мембранах, и во многом определяют эффективность регенерации кости (Gustavsson et al., 2012). Связывание интегрин иницирует кластеризацию рецепто-

ров адгезии, формирование фокальных контактов адгезии, распластывание клеток, реорганизацию актинового цитоскелета и проявление сократительных сил, что активирует такие клеточные функции, как миграция, пролиферация и дифференцировка (Добринская, 2018; Matsuura et al., 2000; Stephansson et al., 2002). Нарушение этих взаимодействий может значительно ингибировать дифференцировку и минерализацию остеобластов, поскольку связывание интегрин приводит к фосфорилированию киназы фокальной адгезии, что, в свою очередь, активирует ERK1/2-зависимый путь (Salasznyk et al., 2007; Marino et al., 2010).

Наряду с химией поверхности, физическое структурирование объема CaP (например, формирование пористости) или поверхности (в частности придание шероховатости) в значительной степени модулирует их биологическую активность. Так, многочисленные исследования показывают, что поверхности с размерами структурных элементов менее 100 нм (шероховатость, зернистость и др.) могут способствовать лучшей адсорбции белка, чем поверхности с размерами более 100 нм (Li et al., 2012). Значительно увеличивает адсорбцию белка высокая пористость CaP-керамики с размером пор в широком диапазоне (от 20 до 500 мкм), которая способствует увеличению удельной площади поверхности, а значит и усилению явлений растворения/преципитации (Othman et al., 2019).

Этот эффект также наблюдается при увеличении количества пор (Jeong et al., 2019), но зависит от структуры и химического состава белка (Zhu et al., 2010; Samavedi et al., 2013). Интересно, что микропористые CaP-скаффолды показали более высокий рост кости в костных дефектах критического размера у коз по сравнению с аутологичными костными трансплантатами или теми же CaP, имеющими более крупные поры на поверхности и, соответственно, меньшую удельную площадь поверхности (Fellah et al., 2008).

С другой стороны, макроструктурирование объема и поверхности материалов может способствовать прямой (без участия остеогенных белков) адгезии клеток (Curtis, Wilkinson, 1997) и дифференцировке МСК в остеобласты, синтезирующие минерализованный костный матрикс (Khilusov et al., 2020). Исследования показывают, что для оптимального костеобразования CaP-материалам необходима макрошероховатая или макропористая структура с диаметром пор более 100 мкм (Ebrahimi, 2021), поскольку формирование кости происходит, в основном, в вогнутых участках пор (Ripamonti, Roden, 2011). В этом плане концепция искусственных ниш для МСК, согласно которой дифференцировка стволовых клеток в остеобласты преобладает в углублениях CaP-

поверхности определенного размера (Khlusov et al., 2013), в какой-то степени объясняет биомиметическое подобие искусственных макропор естественным микротерриториям (ямкам) для остеобластов, формируемым остеокластами при естественной (физиологической и репаративной) регенерации кости (Khlusov et al., 2022).

Кроме того, размер пор влияет на ангиогенез (Wang et al., 2014). Показано, что вращение кровеносных сосудов и костной ткани в скаффолд возможно при размере пор более 50 мкм (Habibovic et al., 2006; Shi et al., 2022). Высказано предположение, что низкое напряжение кислорода в центральной области имплантатов может спровоцировать дедифференцировку перicyтов из кровеносных сосудов в остеобласты (Diaz-Flores et al., 1992). Таким образом, распределение питательных веществ, клеток и последующее образование капилляров должны предшествовать процессу эктопического формирования кости, при их недостатке этот процесс может быть задержан или снижен (Habibovic et al., 2006).

В дополнение к физическим свойствам, таким как шероховатость и пористость, адсорбция белка и клеток зависит от поверхностного заряда (дзета-потенциала) искусственного материала. Адсорбция белка на СаР-керамике опосредована электростатическими взаимодействиями как с катионными кальциевыми центрами, так и с анионными фосфатными сайтами, но зависит от структуры и химического состава белков (Kandogri et al., 2004, 2007). Так, гибкие клеточно-адгезивные белки (например, фибронектин и витронектин) могут подвергаться структурной перестройке и адсорбироваться на поверхности СаР-керамики, в то время как фибриллярные белки (например, коллагены) – нет (Zhu et al., 2009). Таким образом, наличие катионных атомов и молекул (например, кальция) и способность белков адаптироваться к рельефу поверхности, по-видимому, облегчают белковую адсорбцию на плохо растворимых СаР, таких как НАР.

Поверхностный заряд через изменения концентрации и конформации адсорбированных белков способен модулировать клеточную адгезию на поверхности имплантата. Например, показано, что отрицательно заряженные титановые имплантаты, покрытые Ca^{2+} , улучшают адгезию остеобластов по сравнению с имплантатами, покрытыми анионами фосфата (Feng et al., 2004). В этом плане может идти прямое электростатическое взаимодействие кальцинированной поверхности титана с отрицательно заряженными остеобластами (Chen et al., 2011).

Интересно, что МСК предпочитают дифференцироваться в остеобласты, позитивные по щелочной фосфатазе и остеокальцину в углублениях СаР-покрытия, несущих локальный отрицательный заряд поверхности. В свою очередь, МСК с фенотипом остеокластоподобных клеток (с экспрессией кислой фосфатазы) располагаются на выступах (сфероли-

тах) СаР-поверхности (Khlusov et al., 2013, 2018). При этом неравномерное распределение заряда по рельефу поверхности обусловлено преимущественным распределением фосфатных групп “кислых” СаР в углублениях поверхности, что способствует избыточному отрицательному заряду СаР-наночастиц, формирующих микрометровые сферолиты микродугового покрытия (Khlusov et al., 2018).

Помимо поверхностного заряда, на адсорбцию белка влияет и природа ионного окружения. Например, показано, что адсорбция белка зависит от величины рН и ионной силы водной среды (Zhu et al., 2007); в частности, авторы сообщают об уменьшении адсорбции бычьего сывороточного альбумина на частицах двухфазного СаР либо при повышении рН среды, либо при увеличении концентрации ионов фосфата. Растворимость СаР-керамики также может влиять на адсорбцию белка, воздействуя на равновесную концентрацию ионов вблизи поверхности материала и рН среды (Samavedi et al., 2013; Jeong et al., 2019). Эту гипотезу поддерживают данные о том, что адсорбция фибриногена, инсулина и коллагена I типа на поверхности двухфазного СаР более высокая, чем на поверхности НАР, поскольку более растворимая фаза β -ТСР в двухфазном СаР способствует локальному увеличению концентрации ионов, поверхностного заряда и значений рН (Zhu et al., 2010). Показано, что СККМ кролика лучше адгезируют к НАР (с более высокой кристалличностью), чем к аморфным СаР (с более низкой кристалличностью и высокой растворимостью) сопоставимых размеров (Hu et al., 2007). Аналогичные результаты получены в работах, изучающих прикрепление остеобластов свода черепа крыс к различным типам СаР-керамики (Verube et al., 2005).

СаР-керамика также может влиять на поведение клеток, меняя концентрации ионов в растворе посредством механизмов адсорбции/выщелачивания (Gustavsson et al., 2012). Показано, что остеобластоподобные клетки MG-63 прикреплялись и распространялись на стабильных, менее растворимых поверхностях, таких как НАР, в то время на растворимых поверхностях (β -ТСР), клеток почти не наблюдали (John et al., 2003). Плохую адгезию и распластывание клеток по поверхности β -ТСР авторы связывают с быстрым выщелачиванием ионов фосфата и переосаждением апатитового слоя на поверхности, что приводит к повышению уровня фосфора и снижению концентрации кальция в культуральной среде с β -ТСР. Другие авторы подтвердили, что высвобождение ионов и рекристаллизация (возможно, в виде апатита) регулируют клеточную адгезию и пролиферацию СККМ крыс на разных поверхностях (Knabe et al., 2000).

Таким образом, стабильные кристаллические разновидности СаР-керамики, по-видимому, влияют на адгезию клеток и остеогенных молекул, преимущественно, через биомиметическую структуру,

подобную структуру костной ткани, заряженные центры и конформационную перестройку адгезирующих белков, выполняя роль строительных лесов (скаффолдов) для костных клеток; аморфная и растворимая СаР-керамика способствует изменению концентрации ионов (электрокинетического потенциала) и локального уровня рН вблизи искусственных поверхностей. По-видимому, в обоих случаях *in vivo* реализуются сценарии остеогенеза, связанные с преимущественной остеоиндукцией (врастанием кости в структуру) на стабильных СаР-поверхностях или остеоиндукцией (образованием кости *de novo* из стволовых клеток) вблизи более растворимых форм фосфатов кальция (Карлов, Хлусов, 2003). В связи с этим, СаР-материалы с контролируемой биодеградацией их структуры (поверхности) и сохранением оптимальной биомеханики можно считать идеальными имплантатами для репаративной регенерации и минерализации заново образованной костной ткани. Тем не менее, пока поиски идеальных СаР-материалов не увенчались успехом, выявление ведущего вектора их применения (переломы, локальный или системный остеопороз, замедленная консолидация, ложные суставы, несрастающиеся переломы и др.) на основе индивидуальных характеристик поверхности и, соответственно, формирование панели имплантатов для конкретных клинических ситуаций может решить многие текущие задачи биоинженерии костной ткани.

СаР-МАТЕРИАЛЫ, МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ИММУНИТЕТ И ОСТЕОГЕНЕЗ

Достижения в области остеоиммунологии (Okamoto, Takayanagi, 2019) рассматривают продуктивное воспаление в ответ на имплантацию СаР-материалов как один из потенциальных механизмов, модулирующих процессы остеоиндукции (Юрова и др., 2020). Фундаментальные исследования последних лет выявили динамические взаимодействия между системой скелета и иммунной системой (Chang et al., 2008). Было показано, что популяция так называемых костных макрофагов (OsteoMacs), находящихся внутри кости в виде характерной структуры купола, покрывающей зрелые остеообласты (Chang et al., 2008), является важным типом клеток в регенерации костной ткани (Batoon et al., 2017a), что подтверждают эксперименты на нокаутных по OsteoMacs моделях мышей с повреждением бедренной кости (Batoon et al., 2017b). До недавнего времени считали (van Furth, Cohn, 1968), что предшественниками резидентных тканевых макрофагов являются моноциты крови. Однако, согласно новым данным, большинство макрофагов, включая OsteoMacs, самообновляются в резидентных тканях (Davies et al., 2013).

К настоящему времени установлено, что моноциты (макрофаги), появляющиеся в инфильтрате в зоне имплантации, участвуют не только в формиро-

вании соединительной ткани, но и являются основными эффекторными клетками в иммунных реакциях на биоматериалы, модулирующими остеогенез (Miron, Bosshardt, 2016). Так, изучение нокаутных моделей продемонстрировало, что потеря макрофагов вокруг костнопластических материалов может полностью отменить их остеоиндуктивную способность, что подтверждает их ключевое значение в модуляции иммунной системы, контролирующей процессы костеобразования (Davison et al., 2014).

Для изучения роли макрофагов в репаративном остеогенезе использовали β -ТСР в качестве модельного биоматериала (Chen et al., 2014). Было показано, что данный СаР поляризовал макрофаги в регенераторный фенотип M2, что было связано с активацией сигнального пути рецептора, чувствительного к кальцию. Также было обнаружено, что данные макрофаги после стимуляции β -ТСР экспрессировали BMP-2, что указывает на возможность их участия в остеогенезе (Chen et al., 2014).

Стимуляция моноцитов/макрофагов в ответ на имплантацию СаР способствует образованию так называемых многоядерных гигантских клеток (MNGC), появление которых ранее пытались охарактеризовать как часть реакции на инородное тело, поскольку MNGC продуцируют значительное количество провоспалительных цитокинов, включая IL-1b, TNF- α , IL-6, IL-8 и воспалительный белок макрофагов MIP-1 β (Vasconcelos et al., 2015). Такие MNGC образуются путем слияния моноцитов (макрофагов) на различных костных заменителях, не окруженных костью. Гистохимически они слегка положительны при окраске на тартрат-резистентную кислую фосфатазу (TRAP) и иногда связаны с небольшими лакунами резорбции, что указывает на потенциальную остеокластоподобную активность (McNally et al., 2008).

В настоящее время MNGC отводится немаловажная роль в регуляции остеогенеза. Многочисленные исследования неизменно демонстрируют высокое количество MNGC вокруг трансплантатов костных заменителей и корреляцию их наличия с лучшим сохранением костной массы в местах трансплантации (Jensen et al., 2014). MNGC, полученные *in vitro*, могут растворять NRP, хотя и не так эффективно, как остеокласты, но не способны резорбировать костный матрикс (ten Harkel et al., 2015).

Продемонстрировано, что MNGC не резорбируют кость, но экспрессируют молекулы фенотипа макрофагов M2 (Ym1 и Alox15), заживляющих раны и прекращающих воспаление (Katsuyama et al., 2015). Тем не менее, при повторных заменах суставов обнаруживали MNGC, преимущественно экспрессирующие воспалительные факторы поляризации M1 (Nich et al., 2013).

Следует отметить, что интегриновые рецепторы β 1 и β 2 являются преобладающими связывающими доменами во время развития моноцитов и макрофа-

гов (McNally, Anderson, 1995). IL-4 и IL-13 являются двумя важными цитокинами для слияния и образования MNGC и, как полагают, продуцируются в основном Т-лимфоцитами (McNally, Anderson, 1995; Rodriguez et al., 2009). Кроме того, для слияния макрофагов с образованием MNGC необходима матриксная металлопротеиназа MMP-9 (MacLauchlan et al., 2009). Поверхностные рецепторы во время слияния включают CD44, CD47, CD200, сигнальный регуляторный белок 1a, IL-4r, E-кадгерин и рецептор маннозы (Anderson et al., 2008).

Было показано, что MNGC изначально прикрепляются к компонентам комплемента и фибриногену, а позднее взаимодействует с витронектином (McNally et al., 2008). В слиянии, функционировании и выживании MNGC также участвуют STAT6, рецептор P2X7 и коннексин 43 (Moreno et al., 2007). Выявлено, что макрофаги/MNGC экспрессируют HLA-DR, CD98, B7-2 (CD86) и B7eH1 (PD-L1), но не B7-1 (CD80) или B7eH2 (B7RP-1). При этом на них не обнаруживаются некоторые молекулы, обнаруженные на остеокластах (кальцитониновый рецептор, тартратрезистентная кислая фосфатаза и RANK) или дендритных клетках (CD1a, CD40, CD83, CD95/fas); в то же время, выявлена презентация интегрин X (CD11c), CD68 и DC-SIGN, специфичных для дендритных клеток (McNally, Anderson, 2011).

Важно отметить, что моноциты/макрофаги секретируют макрофагальный воспалительный белок MIP-1 α (макрофагальный воспалительный белок 1 α) и моноцитарный хемотрактантный белок-1 (MCP-1), являющиеся эффекторами усиленной миграции MCK (Sadowska et al., 2019).

Несмотря на то, что секреторная роль MCK в регенерации кости на CaP-биоматериалах остается неясной, немногочисленные данные указывают на участие их иммуномодулирующих свойств (Rana et al., 2022). Интересно, что совместная трансплантация CaP и MCK усиливает мобилизацию в место имплантации макрофагов, поляризованных как в сторону провоспалительного (M1), так и противовоспалительного (M2) фенотипов (Gambelin et al., 2014). Баланс этих фенотипов играет ключевую роль в каскаде заживления кости, предотвращая развитие хронического воспаления и способствуя переходу к формированию кости (Pajarinen et al., 2018). Однако существующие сведения о влиянии этих типов макрофагов на остеобластогенез достаточно противоречивы (Pajarinen et al., 2018). Недавние исследования показали, что макрофаги M1 усиливают раннюю остеогенную дифференцировку без какого-либо влияния на минерализацию матрикса, которая впоследствии усиливается макрофагами с фенотипом M2 (Zhang et al., 2017). Следует отметить, что MCK имеют тенденцию ограничивать поляризацию мак-

рофагов до M1, отдавая предпочтение поляризации M2 (Иванюк и др., 2018).

Интересно, что MCK, трансплантированные с двухфазным CaP, привлекая циркулирующие моноциты, индуцируют их дифференцировку в остеокласты, тем самым способствуя резорбции старой и образованию новой кости (Humbert et al., 2019). Кондиционированные среды из культуры MCK также оказывают прямое положительное влияние на остеокластогенез (Ogata et al., 2017). Этот эффект MCK может быть основан на повышенной секреции или мембранной экспрессии RANKL. Действительно, остеокластогенез в основном регулируется как *in vivo*, так и *in vitro* макрофагальным колониестимулирующим фактором (M-CSF, CSF1) и тройной системой, включающей активатор рецептора ядерного фактора κ B (RANK), его лиганд (RANKL) и остеопротегерин. Следует отметить, что экспрессия этих белков увеличивается по мере созревания остеобластов. M-CSF обеспечивает выживание и пролиферацию предшественников остеокластов, а также позволяет им эффективно реагировать на стимуляцию RANKL. RANKL запускает дифференцировку в остеокласты путем связывания RANK, в то время как остеопротегерин предотвращает взаимодействие в качестве рецептора-приманки для RANKL (Feng, 2014).

Остеокласты играют ключевую роль в гомеостазе и ремоделировании кости, постоянно поддерживая баланс между ее формированием и резорбцией. Это подтверждается их присутствием в месте имплантации CaP перед формированием новой кости (Sims, Martin, 2014). Кроме того, остеокласты высвобождают факторы роста при деградации костного матрикса и, что наиболее важно, экспрессируют факторы хемотаксиса и остеогенеза для остеобластов, такие как BMP6, WNT10b и S1P (Henriksen et al., 2014).

Показано, что остеокласты в ассоциации с CaP или костью секретируют СТНRC1 – белок, усиливающий остеобластогенез (Takeshita et al., 2013). Хотя точный молекулярный механизм, участвующий в рекрутировании остеокластов, остается в значительной степени неизвестным, было показано, что интегрин AV β 3 является доминирующим доменом, связывающим остеокласты, и одним из типичных маркеров, используемых для их дифференциальной идентификации от предшественников макрофагов (Teitelbaum, 2005). Этот интегрин распознает ряд молекул внеклеточного матрикса, включая остеопротегерин, фибронектин, витронектин и фибриноген, которые обычно связываются через RGD-домен пептидов (McNally et al., 2007).

Совсем недавно был описан обратный сигнальный механизм, посредством которого остеокласты,

секретируя везикулы, экспрессирующие RANK, стимулируют мембранный RANKL на поверхности остеобластов, что индуцирует образование кости (Ikebuchi et al., 2018). Кроме того, остеокласты, резорбируя биоматериал, повышают локальные концентрации кальция и фосфата и тем самым способствуют отложению апатитового слоя и рецепции кальция клетками других типов (Bohner, Miron, 2018).

Влияние МСК на другие звенья врожденного и приобретенного иммунитета характеризуется образованием регуляторных дендритных клеток, ингибированием дегрануляции тучных клеток, ограничением эффекторных функций NK-клеток, подавлением пролиферации В-, CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток при одновременном появлении клеток с фенотипом Th2 и Treg (Najar et al., 2016). Внеклеточные везикулы, продуцируемые МСК, также участвуют в иммуномодуляции, переключая фенотип макрофагов с провоспалительного на противовоспалительный, в том числе за счет переноса специфических некодирующих микроРНК (Дьячкова и др., 2022). Кроме того, секреция про- и противовоспалительных молекул (Silva et al., 2018), стимулированными МСК, прямо или косвенно (через модуляцию врожденных и адаптивных иммунных клеток) способствует образованию остеокластов (Humbert et al., 2019),.

Дендритные клетки, фагоцитирующие частицы СаР, через секрецию воспалительных цитокинов стимулируют адаптивный иммунный ответ посредством праймирования Т-клеток (Sokolova et al., 2010), в которых активируемый сигнальный путь NF-κB способствует усиленному высвобождению хемокина CCL5, рекрутирующего МСК в окружающий искусственный скаффолд (Zhao et al., 2020). Поскольку МСК подвергаются остеодифференцировке вскоре после имплантации СаР-материала, новообразованная кость происходит в основном из остеобластов хозяина, что влечет за собой рекрутирование и дифференцировку новых МСК (Millan, et al., 2018). Ремоделирование кости может протекать: 1) через эндохондральную оссификацию, включающую первоначальную дифференцировку МСК в хондробласты, последующую перестройку и кальцификацию хрящевого матрикса с образованием губчатой кости; 2) через внутримембранную оссификацию соединительнотканного зачатка, приводящую к прямой дифференцировке МСК в остеобласты (Dimitriou et al., 2005).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СаР-материалы биосовместимы, адсорбируют регуляторные белки и клетки, оказывая влияние на их генетический и секреторный аппарат, и запускают процесс дифференцировки МСК в остеогенном

направлении. Васкуляризация СаР-скаффолдов, в том числе за счет биодеградации (биорезорбции) объема и (или) их поверхности, обеспечивает в дальнейшем рост и продвижение костной ткани в структуру скаффолдов. Модуляция как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа регулирует локальное (в месте имплантации) воспаление и репаративную регенерацию кости. При этом успешная реализация локальных механизмов остеоинтеграции на границе раздела кость—имплантат снижает риск перипротезной инфекции (Raphel et al., 2016) и отторжения искусственных изделий.

Мы попытались на рис. 1 схематически отразить описанные в обзоре основные взгляды на локальную биосовместимость, клетки-мишени и молекулярные (прямые и опосредованные через растворение) эффекты СаР-материалов и покрытий, обладающих остеоинтегрирующим потенциалом. В связи с многогранностью клеточно-молекулярных механизмов остеоинтеграции имплантатов (рис. 1) возникает естественный вопрос: каков размер территории их реализации, чтобы считать описанные в обзоре процессы относительно локальными, не затрагивающими в значительной степени системные (интегральные) механизмы регуляции регенерации?

Костная ткань, как любая биологическая ткань, имеет свою иерархию, которая топографически формируется из природных микротерриторий, в частности нишеподобных образований (размерностью примерно 40–100 мкм) для стволовых клеток, остеобластов (Khlusov et al., 2022) и остеонов — структурно-функциональных (анатомических) единиц костной ткани (внутренний диаметр до 200 мкм; длина до 10 мм) (Maggiano et al., 2016) с доменоподобной организацией (Maloney et al., 1978) популяций костных клеток. По-видимому, воспалительные (репаративные) процессы, протекающие в указанных анатомических границах, можно рассматривать как локальные, реализующиеся посредством механизмов физиологической регенерации костной ткани, не предполагающей существенной активации стресс-реализующих систем, способных негативно влиять на приживание имплантата.

Отсюда в практическом плане следует гипотеза, что СаР-материалы и покрытия, несущие искусственные аналоги естественных остеогенных микротерриторий (ниш, доменов) (например: Khlusov et al., 2011), могут рассматриваться как биомиметические (биоинспирированные) биоинженерные конструкции, во многом реализующие местные физиологические механизмы их остеоинтеграции. Разработка подобных материалов позволит осуществить значительный прорыв в решении современных проблем регенерации костной ткани,

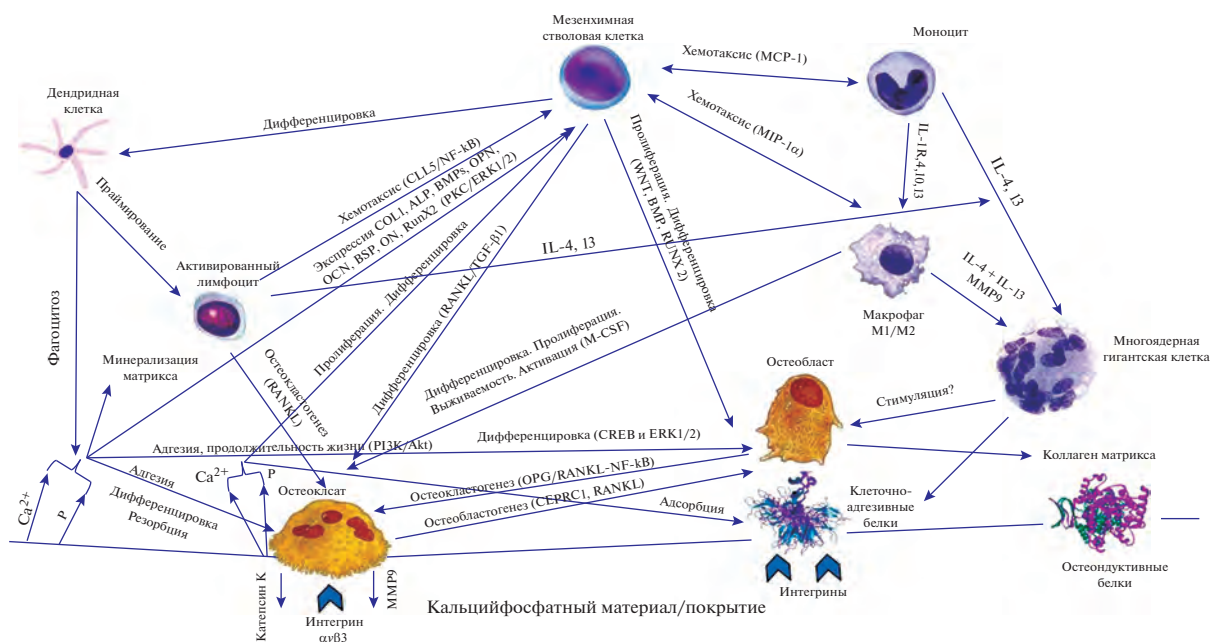


Рис. 1. Клеточные и молекулярные эффекторные системы, участвующие в локальной остеомодулирующей (остеогенной/резорбтивной) активности кальцийфосфатных материалов и покрытий для биоинженерии костной ткани. Объяснения в тексте.

связанный с точным (цифровым) биоинженерным подходом на основе аддитивных технологий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Сибирского государственного медицинского университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием людей или животных авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Добринская М.Н.* 2018. Влияние новых нанодисперсных допированных макро- и микроэлементами карбонат-фосфатов кальция на организм экспериментальных животных. Автореф. канд. дис. Екатеринбург. 20 с. (*Dobrinskaya M.N.* Influence of new nanosized calcium carbonate-phosphates doped with macro- and microelements on the body of experimental animals. Ph. D. Thesis. Yekaterinburg. 20 pp.).
- Дьячкова У.Д., Виговский М.А., Басалова Н.А., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю.* 2022. Внеклеточные везикулы МСК переключают фенотип макрофагов с провоспалительного на противовоспалительный. Гены и клетки. Т. 7. № 3. С. 81. (*Dyachkova U.D., Vigovsky M.A., Basalova N.A.,*

Grigorieva O.A., Efimenko A.Yu. 2022. MSC extracellular vesicles switch the macrophage phenotype from pro-inflammatory to anti-inflammatory. Genes and cells. V. 7. No 3. P. 81.)

Иванюк Е.Э., Надеждин С.В., Покровская Л.А., Шуплетцова В.В., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Малащенко В.В., Литвинова Л.С., Хлусов И.А. 2018. Субпопуляции макрофагов и мезенхимные стволовые клетки в регуляции ремоделирования костной ткани. Цитология. Т. 60. № 4. С. 252. (*Ivanyuk E.E., Nadezhdin S.V., Pokrovskaya L.A., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Litvinova L.S., Khlusov I.A.* 2018. Macrophage subpopulations and mesenchymal stem cells in the regulation of bone tissue remodeling. Tsitologiya. V. 60. № 4. P. 252).

Карлов А.В., Хлусов И.А. 2003. Зависимость процессов репаративного остеогенеза от поверхностных свойств имплантатов для остеосинтеза. Гений ортопедии № 3. С. 46. (*Karlov A.V., Khlusov I.A.* 2003. Dependence of the processes of reparative osteogenesis on the surface properties of implants for osteosynthesis. Orthopedic genius. № 3. P. 46).

Корель А.В., Кузнецов С.Б. 2019. Тканеинженерные стратегии для восстановления дефектов костной ткани. Современное состояние вопроса. Межд. журн. прикладных и фундаментальных исследований. № 4. С. 228. (*Korel A.V., Kuznetsov S.B.* 2019. Tissue engineering strategies for the restoration of bone defects. The current state of the issue. International J. Applied Basic Res. № 4. P. 228).

Пичугин В.Ф., Сурменева М.А., Сурменев Р.А., Хлусов И.А., Энгле М. 2011. Исследование физико-химических и биологических свойств кальцийфосфатных покрытий, созданных методом ВЧ-магнетронного распыления кремнийзамещенного гидроксиапатита. Поверх-

- ность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. № 9. С. 54 (Pichugin V.F., Surmeneva M.A., Surmenev R.A., Khlusov I.A., Eppl M. 2011. Study of physicochemical and biological properties of calcium phosphate coatings prepared by RF magnetron sputtering of silicon-substituted hydroxyapatite. J. Surf. Investig. № 5. P. 863.).
- Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., Мелашченко Е.С., Литвинова Л.С. 2020. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор. Цитология. Т. 62. № 5. С. 305. (Yurova K.A., Khaziyakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Norkin I.K., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Shunkin E.O., Todosenko N.M., Melashchenko E.S., Litvinova L.S. 2020. Cellular and molecular aspects of inflammation, angiogenesis and osteogenesis. Short review. Tsitologiya. V. 62. № 5. P. 305.).
- Albee F.H. 1920. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. Ann. Surg. V. 71. P. 32.
- Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. Seminars Immunol. V. 20. P. 86.
- Barradas A.M., Fernandes H.A., Groen N., Chai Y.C., Schrooten J., van de Peppel J., van Leeuwen J.V., van Blitterswijk C.V., de Boer J. 2012. A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Biomaterials. V. 33. P. 3205.
- Barradas A.M., Yuan H., van Blitterswijk C.A.C., Habibovic P. 2011. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. Eur. Cells Mater. V. 21. P. 407.
- Batoon L., Millard S.M., Raggatt L.J., Pettit A.R. 2017a. Osteomacs and bone regeneration. Curr. Osteoporos Rep. V. 15. P. 385.
- Batoon L., Millard S.M., Wullschlegel M.E., Preda C., Wu A.C.-K, Kaur S., Tseng H.-W., Hume D.A., Levesque J.-P., Raggatt L.J., Pettit A.R. 2017b. CD169 + macrophages are critical for osteoblast maintenance and promote intramembranous and endochondral ossification during bone repair. Biomaterials. V. 196. P. 51.
- Bellows C.G., Aubin J.E., Heersche J.N. 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. Bone Min. V. 14. P. 27.
- Ben-Nissan B. 2014. Advances in calcium phosphate biomaterials. Springer Berlin: Heidelberg. P. 547.
- Berube P., Yang Y., Carnes D.L., Stover R.E., Boland E.J., Ong J.L. 2005. The effect of sputtered calcium phosphate coatings of different crystallinity on osteoblast differentiation. J. Periodontol. V. 76. P. 1697.
- Bianchi M., Urquia Edreira E.R., Wolke J.G., Birgani Z.T., Habibovic P., Jansen J.A., Tampieri A., Marcacci M., Leeuwenburgh S.C., van den Beucken J.J. 2014. Substrate geometry directs the in vitro mineralization of calcium phosphate ceramics. Acta Biomater. V. 10. P. 661.
- Bohner M., Miron R.J. 2018. A proposed mechanism for material-induced heterotopic ossification, Mater. Today. V. 22. P. 132.
- Boix T., Gomez-Morales J., Torrent-Burgues J., Monfort A., Pulgdomenech P., Rodriguez-Clemente R. 2005. Adsorption of recombinant human bone morphogenetic protein rhBMP-2m onto hydroxyapatite. J. Inorg. Biochem. V. 9. P. 1043.
- Bulnheim U., Müller P., Neumann H.-G., Peters K., Unger R.E., Kirkpatrick C.J., Rychly J. 2012. Endothelial cells stimulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffolds. J. Tissue Engineering and Regener. Med. V. 8. P. 831.
- Campana V., Milano G., Pagano E., Barba M., Cicione C., Salonna G., Lattanzi W., Logroscino G. 2014. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. J. Mater. Sci. Mater. Med. V. 25. P. 2445.
- Chai Y.C., Roberts S.J., Schrooten J., Luyten F.P. 2011. Probing the osteoinductive effect of calcium phosphate by using an in vitro biomimetic model. Tiss. Eng. A. V. 17. P. 1083.
- Chang D.T., Jones J.A., Meyerson H., Colton E., Kwon I.K., Matsuda T., Anderson J.M. 2008. Lymphocyte/macrophage interactions: biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. J. Biomed. Mater. Res. A. V. 87. P. 676.
- Chen L., Mccrate J.M., Lee J.C., Li H. 2011. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. Nanotechnol. V. 22: 105708.
- Chen Z., Wu C., Gu W., Klein T., Crawford R., Xiao Y. 2014. Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by beta-tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway. Biomaterials. V. 35. P. 1507.
- Combes C., Ray C. 2002. Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity. Biomaterials. V. 23. P. 2817.
- Coughlan T., Dockery F. 2014. Osteoporosis and fracture risk in older people. Clin. Med. (Lond). V. 14. P. 187.
- Curtis A., Wilkinson C. 1997. Topographical control of cells. Biomaterials. V. 18. P. 1573.
- Daculsi G., Legeros R.Z., Nery E., Lynch K., Kerebel B. 1989. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. J. Biomed. Mater. Res. V. 23. P. 883.
- Danciu T.E., Adam R.M., Naruse K., Freeman M.R., Hauschka P.V. 2003. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. FEBS Lett. V. 536. P. 193.
- Davies L.C., Rosas M., Jenkins S.J., Liao C.T., Scurr M.J., Brombacher F., Fraser D.J., Allen J.E., Jones S.A., Taylor Ph.R. 2013. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. Nat. Commun. V. 4. P. 1886.
- Davison N.L., Gamblin A.L., Layrolle P., Yuan H., de Bruijn J.D., Barrere-de Groot F. 2014. Liposomal clodronate inhibition of osteoclastogenesis and osteoinduction by submicrostructured beta-tricalcium phosphate. Biomaterials. V. 35. P. 5088.
- Diaz-Flores L., Gutierrez R., Lopez-Alonso A., Gonzalez R., Varela H. 1992. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. Clin. Orthop. Relat. Res. V. 275. P. 280.
- Dimitriou R., Tsiridis E., Giannoudis P.V. 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury. V. 36. P. 1392.
- Du C., Cui F.Z., Zhang W., Feng Q.L., Zhu X.D., de Groot K. 2000. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. J. Biomed. Mater. Res. V. 50. P. 518.

- Ebrahimi M.* 2021. Porosity parameters in biomaterial science: Definition, impact, and challenges in tissue engineering. *Front. Mater. Sci.* V. 15. P. 352.
- Edwards F.C., Taheri A., Dann S.C., Dye J.F.* 2011. Characterization of cytolytic neutrophil activation in vitro by amorphous hydrated calcium phosphate as a model of biomaterial inflammation. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 96. P. 552.
- Ekegren C.L., Edwards E.R., de Steiger R., Gabbe B.J.* 2018. Incidence, costs and predictors of non-union, delayed union and mal-union following long bone fracture. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* V. 15. P. 2845.
- El-Rashidy A.A., Roether J.A., Harhaus L., Kneser U., Boccacini A.R.* 2017. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: a review of *in vivo* studies in bone defect models. *Acta Biomater.* V. 62. P. 1.
- Fellah B.H., Gauthier O., Weiss P., Chappard D., Layrolle P.* 2008. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials.* V. 29. P. 1177.
- Feng B., Weng J., Yang B.C., Qu S.X., Zhang X.D.* 2004. Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion. *Biomaterials.* V. 25. P. 3421.
- Feng W.* 2014. Osteoclastogenesis and osteoimmunology. *Front. Biosci.* V. 19. P. 758.
- Fillingham Y., Jacobs J.* 2014. Bone grafts and their substitutes. *J. Indian Soc. Periodontol.* V. 18. P. 610.
- Flade K., Lau C., Mertig M., Pompe W.* 2001. Osteocalcin-controlled dissolution-precipitation of calcium phosphate under biometric conditions. *Chem. Mater.* V. 13. P. 3596.
- Foreman M.A., Gu A.Y., Howl J.D., Jones S., Publicover S.J.* 2005. Group III metabotropic glutamate receptor activation inhibits Ca^{2+} influx and nitric oxide synthase activity in bone marrow stromal cells. *J. Cell Physiol.* V. 204. P. 704.
- Gamblin A.-L., Brennan M.A., Renaud A., Yagita H., Lézet F., Heymann D., Trichet V., Layrolle P.* 2014. Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages. *Biomaterials.* V. 35. P. 9660.
- Garg P., Mazur M.M., Buck A.C., Wandtke M.E., Liu J., Ebraheim N.A.* 2017. Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts. *Orthop Surg.* V. 9. P. 13.
- Ghosh S.K., Nandi S.K., Kundu B., Datta S., De D.K., Roy S.K., Basu D.* 2008. In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* V. 86. P. 217.
- Goding J.W., Grobber B., Slegers H.* 2003. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* V. 1638. P. 1.
- Gustavsson J., Ginebra M. P., Planell J., Engel E.* 2012. Osteoblast-like cellular response to dynamic changes in the ionic extracellular environment produced by calcium-deficient hydroxyapatite. *JMSMM.* V. 23. P. 2509.
- Habibovic P., Sees T.M., van den Doel M.A., van Blitterswijk C.A., de Groot J.K.* 2006. Osteoinduction by biomaterials—physicochemical and structural influences. *Biomed. Mater. Res. A.* V. 77. P. 747.
- Hasegawa T., Hongo H., Yamamoto T., Abe M., Yoshino H., Haraguchi-Kitakamae M., Ishizu H., Shimizu T., Iwasaki N., Amizuka N.* 2022. Matrix vesicle-mediated mineralization and osteocytic regulation of bone mineralization. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 9941.
- Henriksen K., Karsdal M.A., John Martin T.* 2014. Osteoclast-derived coupling factors in bone remodeling. *Calcif. Tiss. Int.* V. 94. P. 88.
- Hu Q.H., Tan Z., Liu Y.K., Tao J.H., Cai Y.R., Zhang M., Pan H., Xu X., Tang R.* 2007. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem.* V. 17. P. 4690.
- Humbert P., Brennan M.A., Davison N., Rosset Ph., Trichet V., Blanchard F., Layrolle P.* 2019. Immune modulation by transplanted calcium phosphate biomaterials and human mesenchymal stromal cells in bone regeneration. *Front. Immunol.* V. 10. P. 663.
- Ikebuchi Y., Aoki S., Honma M., Hayashi M., Sugamori Y., Khan M., Kariya Y., Kato G., Tabata Y., Penninger J.M., Udagawa N., Aoki K., Suzuki H.* 2018. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature.* V. 561. P. 195.
- James A.W.* 2013. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and Adipogenic differentiation. *Scientifica (Cairo).* 2013: 684736.
- Jensen S.S., Bosshardt D.D., Gruber R., Buser D.* 2014. Long-term stability of contour augmentation in the esthetic zone: histologic and histomorphometric evaluation of 12 human biopsies 14 to 80 months after augmentation. *J. Periodontol.* V. 85. P. 1549.
- Jeong J., Kim J.H., Shim J.H., Hwang N.S., Heo C.Y.* 2019. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater. Res.* V. 23. P. 4.
- John A., Varma H.K., Kumari T.V.* 2003. Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in a cell culture system. *J. Biomater.* V. 18. P. 63.
- Julien M., Khoshniat S., Lacreusette A., Gattius M., Bozec A., Wagner E.F., Wittrant Y., Masson M., Weiss P., Beck L., Magne D., Guicheux J.* 2009. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *J. Bone Miner. Res.* V. 24. P. 1856.
- Jung G.Y., Park Y.J., Han J.S.* 2010. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* V. 21. P. 1649.
- Kandori K., Miyagawa K., Ishikawa T.* 2004. Adsorption of immunoglobulin onto various synthetic calcium hydroxyapatite particles. *J. Colloid. Interface Sci.* V. 273. P. 406.
- Kandori K., Murata K., Ishikawa T.* 2007. Microcalorimetric study of protein adsorption onto calcium hydroxyapatites. *Langmuir.* V. 23. P. 2064.
- Karalashvili L., Kakabadze A., Uhrin M., Vyshnevskaya H., Ediberidze K., Kakabadze Z.* 2018. Bone grafts for reconstruction of bone defects (review). *Georgian Med. News.* V. 282. P. 44.
- Katsuyama E., Miyamoto H., Kobayashi T., Sato Y., Hao W., Kanagawa H., Fujie A., Tando T., Watanabe R., Morita M., Miyamoto K., Niki Y., Morioka H., Matsumoto M., Toyama Y. et al.* 2015. Interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) promotes inflammatory osteolysis by activating

- osteoclasts and inhibiting formation of foreign body giant cells. *J. Biol. Chem.* V. 290. P. 716.
- Khlusov I.A., Khlusova M.Yu., Zaitsev K.V., Kolokol'tsova T.D., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Legostaeva E.V., Trofi mova I.E., Klimov A.S., Zhdanova A.I.* 2011. Pilot in vitro study of the parameters of artificial niche for osteogenic differentiation of human stromal stem cell pool. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 150. P. 535.
- Khlusov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Yurova K.A., Shunkin E.O., Krivosheev V.V., Porokhova E.D., Sizikova A.E., Safiullina L.A., Legostaeva E.V., Komarova E.G., Sharkeev Yu.P.* 2020. Costimulatory effect of rough calcium phosphate coating and blood mononuclear cells on adipose-derived mesenchymal stem cells *in vitro* as a model of *in vivo* tissue repair. *Materials.* V. 13. P. 4398.
- Khlusov I.A., Litvinova L.S., Yurova K.A., Khlusova M.Y.* 2022. Precise tissue bioengineering and niches of mesenchymal stem cells: their size and hierarchy matter. *Biocell.* V. 46. P. 1635.
- Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Y.* 2013. Detection in vitro and quantitative estimation of artificial microterritories which promote osteogenic differentiation and maturation of stromal stem cells. *Methods Mol. Biol.* V. 1035. P. 103.
- Khlusov I.A., Dekhtyar Y., Sharkeev Y.P., Pichugin V.F., Khlusova M.Y., Polyaka N., Tjulkins F., Vendinya V., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Prosolov K.A.* 2018. Nanoscale electrical potential and roughness of a calcium phosphate surface promotes the osteogenic phenotype of stromal cells. *Materials.* V. 11. P. 978.
- Khoshniat S., Bourguine A., Julien M., Petit M., Pilet P., Rouillon T., Masson M., Gatius M., Weiss P., Guicheux J., Beck L.* 2011. Phosphatedependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone.* V. 48. P. 894.
- Kim S.E., Park K.* 2020. Recent advances of biphasic calcium phosphate bioceramics for bone tissue regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 1250. P. 177.
- Knabe C., Driessens F.C.M., Planell J.A., Gildenhaar R., Berger G., Reif D., Fitzner R., Radlanski R.J., Gross U.* 2000. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *J. Biomed. Mater. Res.* V. 52. P. 498.
- Komarova E.G., Sharkeev Y.P., Sedelnikova M.B., Prymak O., Epple M., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Malashchenko V.V., Yurova K.A., Dzyuman A.N., Kulagina I.V., Mushtovatova L.S., Bochkareva O.P., Karpova M.R., Khlusov I.A.* 2020. Zn- or Cu-containing CaP-based coatings formed by micro-arc oxidation on titanium and Ti-40Nb alloy: part II – wettability and biological performance. *Materials.* V. 13. P. 4366.
- Kuroda Y., Hisatsune Ch., Nakamura T., Matsuo K., Mikoshiba K.* 2008. Osteoblasts induce Ca²⁺ oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 105. P. 8643.
- Li B., Liao X.L., Zheng L., Zhu X.D., Wang Z., Fan H.S., Zhang X.* 2012. Effect of nanostructure on osteoinduction of porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Acta Biomater.* V. 8. P. 3794.
- Litvinova L., Yurova K., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Shunkin E., Melashchenko E., Todosenko N., Khlusova M., Sharkeev Y., Komarova E., Sedelnikova M., Khlusov I.* 2020. Gene expression regulation and secretory activity of mesenchymal stem cells upon in vitro contact with microarc calcium phosphate coating. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 7682.
- Liu D., Genetos D.C., Shao Y., Geist D.J., Li J., Ke H.Zh., Turner Ch.H., Duncan R.L.* 2008. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca²⁺ and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. *Bone.* V. 42. P. 644.
- Liu Q., Lu W.F., Zhai W.* 2022. Toward stronger robocast calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering: A mini-review and meta-analysis. *Biomater. Adv.* V. 134. P. 112578.
- Liu Y.K., Lu Q.Z., Pei R., Ji H.J., Zhou G.S., Zhao X.L., Tang R.K., Zhang M.* 2009. The effect of extracellular calcium and inorganic phosphate on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro: implication for bone tissue engineering. *Biomed. Mater.* V. 4: 025004.
- MacLauchlan S., Skokos E.A., Mezmarich N., Zhu D.H., Raouf S., Shipley J.M., Senior R.M., Bornstein P., Kyriakides Th.R.* 2009. Macrophage fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase 9. *J. Leukoc. Biol.* V. 85. P. 617.
- Mafina M.K., Sullivan A.C., Hing K.A.* 2017. Use of a fluorescent probe to monitor the enhanced affinity of rh-BMP-2 to silicated-calcium phosphate synthetic bone graft substitutes under competitive conditions. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* V. 80. P. 207.
- Maggianno I.S., Maggianno C.M., Clement J.G., Thomas C.D., Carter Y., Cooper D.M.* 2016. Three-dimensional reconstruction of Haversian systems in human cortical bone using synchrotron radiation-based micro-CT: morphology and quantification of branching and transverse connections across age. *J. Anat.* May. V. 228. P. 719.
- Majidinia M., Sadeghpour A., Yousefi B.* 2018. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J. Cell Physiol.* V. 233. P. 2937.
- Maloney M.A., Dorie M.J., Lamela R.A., Rogers Z.R., Patt H.M.* 1978. Hematopoietic stem cell regulatory volumes as revealed in studies of the bgj/bgj:W/WV chimera. *J. Exp. Med.* V. 147. P. 1189.
- Mao L., Liu J., Zhao J., Chang J., Xia L., Jiang L., Wang X., Lin K., Fang B.* 2015. Effect of micro-nano-hybrid structured hydroxyapatite bioceramics on osteogenic and cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell via Wnt signaling pathway. *Int. J. Nanomedicine.* V. 8. P. 1887.
- Marino G., Rosso F., Cafiero G., Tortora C., Moraci M., Barbarisi M., Barbarisi A.* 2010. Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* V. 21. P. 353.
- Matsuura T., Hosokawa R., Okamoto K., Kimoto T., Akagawa Y.* 2000. Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium. *Biomaterials.* V. 21. P. 1121.
- McNally A.K., Anderson J.M.* 1995. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage

- fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am. J. Pathol.* V. 147. P. 1487.
- McNally A.K., Anderson J.M. 2011. Foreign body-type multinucleated giant cells induced by interleukin-4 express select lymphocyte co-stimulatory molecules and are phenotypically distinct from osteoclasts and dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol.* V. 91. P. 673.
- McNally A.K., Jones J.A., MacEwan S.R., Colton E., Anderson J.M. 2008. Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4-induced foreign body giant cell formation. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 86A. P. 35.
- McNally A.K., Macewan S.R., Anderson J.M. 2007. Alpha subunit partners to beta1 and beta2 integrins during IL-4-induced foreign body giant cell formation. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* V. 82. P. 568.
- Meleti Z., Shapiro M., Adams C.S. 2000. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone.* V. 27. P. 359.
- Millan C., Vivanco J.F., Benjumbeda-Wijnhoven I.M., Bjelica S., Santibanez J.F. 2018. Mesenchymal stem cells and calcium phosphate bioceramics: implications in periodontal bone regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 1107. P. 1.
- Miron R.J., Bosshardt D.D. 2016. OsteoMacs: key players around bone biomaterials. *Biomaterials.* V. 82. P. 1.
- Moreno J.L., Mikhailenko I., Tondravi M.M., Keegan A.D. 2007. IL-4 promotes the formation of multinucleated giant cells from macrophage precursors by a STAT6-dependent, homotypic mechanism: contribution of E-cadherin. *J. Leukoc. Biol.* V. 82. P. 1542.
- Murshed M. 2018. Mechanism of bone mineralization. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* V. 8: a031229. Erratum in: *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020. V. 10.
- Najar M., Raicevic G., Crompton E., Fayyad-Kazan H., Bron D., Toungouz M., Lagneaux L. 2016. The immunomodulatory potential of mesenchymal stromal cells. *J. Immunother.* V. 39. P. 45.
- Nich C., Takakubo Y., Pajarinen J., Ainola M., Salem A., Sillat T., Rao A.J., Raska M., Tamaki Y., Takagi M., Kontinen Y.T., Goodman St.B., Gallo J. 2013. Macrophages-key cells in the response to wear debris from joint replacements. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 101. P. 3033.
- Nudelman F., Pieterse K., George A., Bomans P.H.H., Friedrich H., Brylka L.J., Hilbers P.A.J., de With G., Somerdijk N.A.J.M. 2010. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat. Mater.* V. 9. P. 1004.
- Ogata K., Katagiri W., Hibi H. 2017. Secretomes from mesenchymal stem cells participate in the regulation of osteoclastogenesis *in vitro*. *Clin. Oral Investig.* V. 21. P. 1979.
- Okamoto K., Takayanagi H. 2019. Osteoimmunology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* V. 9: a031245.
- Orimo H. 2010. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch.* V. 77. P. 4.
- Othman Z., Fernandes H., Groot Arjan J., Luider Theo M., Alcinso A., de Melo Pereira D., Guttenplan Al.P.M., Yuan H., Habibovic P. 2019. The role of ENPP1/PC-1 in osteoinduction by calcium phosphate ceramics *Biomaterials.* V. 210. P. 12.
- Pajarinen J., Lin T., Gibon E., Kohno Y., Maruyama M., Nathan K., Lu L., Yao Zh., Goodman St.B. 2018. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials.* V. 196. P. 80.
- Pchelintseva E., Djamgoz M.B.A. 2018. Mesenchymal stem cell differentiation: Control by calcium-activated potassium channels. *J. Cell Physiol.* V. 233. P. 3755.
- Polini A., Pisignano D., Parodi M., Quarto R., Scaglione S. 2011. Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PLoS One.* V. 6: e26211.
- Quinn J.M.W., Itoh K., Udagawa N., Häusler K., Yasuda H., Shima N., Mizuno A., Higashio K., Takahashi N., Suda T., Martin T.J., Gillespie M.T. 2001. Transforming growth factor β affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J. Bone Miner. Res.* V. 16. P. 1787.
- Rana N., Suliman S., Mohamed-Ahmed S., Gavasso S., Gjertsen B.T., Mustafa K. 2022. Systemic and local innate immune responses to surgical co-transplantation of mesenchymal stromal cells and biphasic calcium phosphate for bone regeneration. *Acta Biomater. Actions.* V. 141. P. 440.
- Raphel J., Holodniy M., Goodman S.B., Heilshorn S.C. 2016. Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials.* V. 84. P. 301.
- Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F., Lemons J. (Eds.) 2004. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* San Diego, CA, USA: Elsevier Acad. Press. 864 p.
- Ripamonti U., Roden L.C. 2010. Induction of bone formation by transforming growth factor-beta2 in the non-human primate *Papio ursinus* and its modulation by skeletal muscle responding stem cells. *Cell Prolif.* V. 43. P. 207.
- Ripamonti U., Roden L.C., Ferretti C., Klar R.M. 2011. Biomimetic matrices self-initiating the induction of bone formation. *J. Craniofac. Surg.* V. 22. P. 1859.
- Rodriguez A., Macewan S.R., Meyerson H., Kirk J.T., Anderson J.M. 2009. The foreign body reaction in T-cell-deficient mice. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 90. P. 106.
- Sadowska J.M., Wei F., Guo J., Guillem-Marti J., Lin Zh., Ginebra M.-P., Xiao Y. 2019. The effect of biomimetic calcium deficient hydroxyapatite and sintered β -tricalcium phosphate on osteoimmune reaction and osteogenesis. *Acta Biomater.* V. 96. P. 605.
- Salasznyk R.M., Klees R.F., Williams W.A., Boskey A., Plopper G.E. 2007. Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* V. 313. P. 22.
- Samavedi S., Whittington A.R., Goldstein A.S. 2013. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* V. 9. P. 8037.
- Sapir-Koren R., Livshits G. 2011. Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis. *IBMS BoneKEY.* V. 8. P. 286.

- Schemitsch E.H.* 2017. Size matters: defining critical in bone defect size! *J. Orthop. Trauma.* V. 31. P. S20.
- Shen B., Bhargav D., Wei A., Williams L. A., Tao H., Ma D.D.F., Diwan A.D.* 2009. BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation. *Int. J. Biol. Sci.* V. 5. P. 192.
- Shi F., Fang X., Zhou T., Huang X., Duan K., Wang J., Qu S., Zhi W., Weng J.* 2022. Macropore regulation of hydroxyapatite osteoinduction via microfluidic pathway. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 11459.
- Silva L.H.A., Antunes M.A., Dos Santos C.C., Weiss D.J., Cruz F.F., Rocco P.R.M.* 2018. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases. *Stem Cell Res. Ther.* V. 9. P. 45.
- Sims N.A., Martin T.J.* 2014. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep.* V. 3. P. 1.
- Sokolova V., Knuschke T., Kovtun A., Buer J., Eppler M., Westendorp A.M.* 2010. The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation. *Biomaterials.* V. 31. P. 5627.
- Stephansson S.N., Byers B.A., Garcia A.J.* 2002. Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding. *Biomaterials.* V. 23. P. 2527.
- Tada H., Nemoto E., Foster B.L., Somerman M.J., Shimauchi H.* 2011. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone.* V. 48. P. 1409.
- Takeshita S., Fumoto T., Matsuoka K., Park K., Aburatani H., Kato S., Ito M., Ikeda K.* 2013. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. *J. Clin. Invest.* V. 123. P. 3914.
- Teitelbaum S.L.* 2005. Osteoporosis and integrins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* V. 90. P. 2466.
- Ten Harkel B., Schoenmaker T., Picavet D.I., Davison N.L., de Vries T.J., Everts V.* 2015. The foreign body giant cell cannot resorb bone, but dissolves hydroxyapatite like osteoclasts. *PLoS ONE.* V. 10: e0139564.
- Thrivikraman G., Athirasala A., Twhig C., Boda S.K., Bertasconi L.E.* 2017. Biomaterials for craniofacial bone regeneration. *Dent Clin. North Am.* V. 61. P. 835.
- Tsapikouni T.S., Missirlis Y.F.* 2008. Protein-material interactions: from micro-to-nano scale. *Mater. Sci. Eng. B.* V. 152. P. 2.
- van Furth R., Cohn Z.A.* 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exper. Med.* V. 128. P. 415.
- Vasconcelos D.P., Costa M., Amaral I.F., Barbosa M.A., Aguas A.P., Barbosa J.N.* 2015. Modulation of the inflammatory response to chitosan through M2 macrophage polarization using pro-resolution mediators. *Biomaterials.* V. 37. P. 116.
- Viti F., Landini M., Mezzelani A., Petecchia L., Milanese L., Scaglione S.* 2016. Osteogenic differentiation of MSC through calcium signaling activation: transcriptomics and functional analysis. *PLoS One.* V. 11: e0148173.
- Vulf M., Khlusov I., Yurova K., Todosenko N., Komar A., Kozlov I., Malashchenko V., Shunkina D., Khaziakhmatova O., Litvinova L.* 2022. MicroRNA regulation of bone marrow mesenchymal stem cells in the development of osteoporosis in obesity. *Front. Biosci. (Schol Ed).* V. 14. P. 17.
- Wang Y., Hu J., Jiao J., Liu Z., Zhou Z., Zhao C., Chang L.J., Chen Y.E., Ma P.X., Yang B.* 2014. Engineering vascular tissue with functional smooth muscle cells derived from human iPS cells and nanofibrous scaffolds. *Biomaterials.* V. 35. P. 8960.
- Xiao D., Zhang J., Zhang C., Barbieri D., Yuan H., Moroni L., Feng G.* 2020. The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved. *Acta Biomater.* V. 106. P. 22.
- Yuan H.P., Fernandes H., Habibovic P., de Boer J., Barradas A.M.C., de Ruiter A., Walsh W.R., van Blitterswijk C.A., de Bruijn J.D.* 2010. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 107. P. 13614.
- Yurova K.A., Melashchenko E.S., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Shunkin E.O., Norkin I.K., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S.* 2021. Osteogenic differentiation factors of multipotent mesenchymal stromal cells in the current understanding. *Curr. Pharm. Des.* V. 27. P. 3741.
- Zayzafoon M., Fulzele K., McDonald J.M.* 2005. Calmodulin and calmodulin-dependent kinase II α regulate osteoblast differentiation by controlling c-fos expression. *J. Biol. Chem.* V. 280. P. 7049.
- Zhang R., Lu Y., Ye L., Yuan B., Yu Sh., Qin Ch., Xie Y., Gao T., Drezner M.K., Bonewald L.F., Feng J.Q.* 2011. Unique roles of phosphorus in endochondral bone formation and osteocyte maturation. *J. Bone Miner. Res.* V. 26. P. 1047.
- Zhang Y., Böse T., Unger R.E., Jansen J.A., Kirkpatrick C.J., van den Beucken J.P.* 2017. Macrophage type modulates osteogenic differentiation of adipose tissue MSCs. *Cell Tiss. Res.* V. 369. P. 273.
- Zhao L., Kaye A.D., Kaye A.J., Abd-Elseyed A.* 2018. Stem cell therapy for osteonecrosis of the femoral head: current trends and comprehensive review. *Curr. Pain Headache Rep.* V. 22. P. 41.
- Zhao Z., Zhao Q., Gu B., Yin C., Shen K., Tang H., Xia H., Zhang X., Zhao Y., Yang X., Zhang Y.* 2020. Minimally invasive implantation and decreased inflammation reduce osteoinduction of biomaterial. *Theranostics.* V. 10. P. 3533.
- Zhu X.D., Fan H.S., Li D.X., Xiao Y.M., Zhang X.D.* 2007. Protein adsorption and zeta potentials of a biphasic calcium phosphate ceramic under various conditions. *J. Biomed. Mater. Res B.* V. 82B. P. 65.
- Zhu X.D., Fan H.S., Xiao Y.M., Li D.X., Zhang H.J., Luxbacher T., Zhang X.D.* 2009. Effect of surface structure on protein adsorption to biphasic calcium-phosphate ceramics in vitro and in vivo. *Acta Biomater.* V. 5. P. 1311.
- Zhu X., Zhang H.J., Fan H.S., Li W., Zhang X.D.* 2010. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. *Acta Biomater.* V. 6. P. 1536.

Review of Local Cellular and Molecular Processes of Bone Tissue Regeneration Induced by Calcium Phosphate Materials

L. A. Miroshnichenko^a, T. Yu. Polyakova^b, L. S. Litvinova^{a, *}, and I. A. Khlusov^a

^aLaboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^bDepartment of Normal Physiology, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

One of the leading causes of hospitalization, disability and mortality of 50% of women and 20% of men over the age of 50 are bone fractures and their complications caused by diseases of the musculoskeletal system. In this regard, an active search for a solution to the problem associated with the limitations of the use of auto-, allo-, and xenografts in the clinic to replace bone defects initiated the development of a regenerative approach based on the gradual replacement of artificial material with growing bone tissue. Promising in this regard are materials based on calcium phosphates, which act as an active source of chemical elements (calcium, phosphorus, etc.), which can optimize the process of bone defect fusion and ensure the replacement of the implant with new bone tissue. The review summarizes literature data on local biological activity, target cells, and molecular effects of calcium phosphates. It has been shown that calcium phosphate materials are biocompatible, capable of adsorbing regulatory proteins and cells, influencing their genetic and secretory apparatus and triggering the process of MSC differentiation in the osteogenic direction. At the same time, the successful implementation of local mechanisms of osseointegration at the “bone/implant” interface reduces the risk of periprosthetic infection (PJI) and rejection of artificial devices. Further study and use of calcium phosphate materials will make it possible to make a significant breakthrough in solving modern problems of bone tissue regeneration associated with an accurate (digital) bioengineering approach based on additive technologies and artificial intelligence.

Keywords: calcium phosphate materials, osteoinduction, osteogenic cells, osteogenesis, regeneration, mesenchymal stem cells, cellular and molecular mechanisms