

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Минайчев Владислав Валентинович

**Клеточные и тканевые аспекты биосовместимости кальций-
фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом**

1.5.22. – Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Фадеева И.С.

Пушино – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ	6
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Структурно-функциональная организация костной ткани.....	14
1.2 Строение внеклеточного матрикса костной ткани	18
1.3 Механизм минерализация костного матрикса	22
1.4 Роль неколлагеновых белков, гликозаминогликанов и микроэлементов в организации и функционировании костной ткани	27
1.4.1 Белки, содержащие γ -карбоксихлутаминовую кислоту	27
1.4.2 Гликопротеины костной ткани	28
1.4.3 Малые интегрин-связывающие лиганды, N-связанные гликопротеины/SIBLINGs	29
1.4.4 Роль протеогликанов в организации и функционировании костной ткани	30
1.4.5 Роль микроэлементов в организации и функционировании костной ткани	31
1.5 Использование кальций-фосфатных соединений в качестве остеопластических материалов.....	32
1.6 Биологические свойства и молекулярно-клеточные механизмы биоинтеграции и отторжения кальций-фосфатных материалов	35
1.6.1 Остеокондуктивные свойства кальций-фосфатных биоматериалов.....	36
1.6.2 Остеоиндуктивные свойства кальций-фосфатных биоматериалов	36
1.6.3 Взаимодействие кальций-фосфатных материалов с клетками, связанными с ангиогенезом.....	40
1.6.4 Взаимодействие между кальций-фосфатными материалами и клетками, ассоциированными с воспалением	41
1.6.5 Провоспалительные свойства кальций-фосфатных материалов	42
1.6.6 Механизмы резорбции материалов на основе кальций-фосфатных соединений	46
1.7 Влияние физико-химических свойств кальций-фосфатных материалов на их биологические свойства	48
1.7.1 Влияние фазового состава и растворимости на биологические свойства кальций-фосфатных материалов	48
1.7.2 Влияние пористости кальций-фосфатных материалов на их биологические свойства.....	50
1.7.3 Влияние топографии и поверхностного заряда кальций-фосфатных биоматериалов на их биологические свойства	51

1.7.4 Влияние размера частиц на биологические свойства кальций-фосфатных биоматериалов	53
1.8 Современные подходы повышения биосовместимости и остеогенных свойств кальций-фосфатных биоматериалов	54
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	58
2.1 Материалы	58
2.1.1 Культуры клеток	58
2.1.2 Кальций-фосфатные материалы	58
2.1.2.1 Синтез и физико-химические свойства гидратированной кальций-фосфатной пасты, подвергшейся температурной обработке	58
2.1.2.2 Синтез и физико-химические свойства низкотемпературной гидратированной кальций-фосфатной пасты	60
2.1.2.3 Синтез и исследование физико-химических свойств порошкообразных дигидрата дикальцийфосфата, октакальций фосфата и его Sr-замещенных модификаций	63
2.1.2.4 Низкотемпературный гидроксипатит	69
2.1.3 Деминерализованный костный матрикс	70
2.1.4 Реминерализованный костный матрикс	70
2.1.5 Экспериментальные животные	72
2.2 Методы	72
2.2.1 Стерилизация кальций-фосфатных биоматериалов	72
2.2.2 Исследование физико-химических свойства кальций-фосфатных биоматериалов	72
2.2.2.1 Рентгенофазовый анализ	72
2.2.2.2 Рентгенофлуоресцентный анализ	73
2.2.2.3 ИК спектроскопия	73
2.2.2.5 Сканирующая электронная микроскопия	73
2.2.2.5.1 Исследование поверхности материалов методом сканирующей электронной микроскопии	73
2.2.2.5.2 Исследование клеточной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии	73
2.2.2.6 Микрокомпьютерная томография	74
2.2.2.7 Измерение адсорбции белка	74
2.2.2.8 Измерение остаточной ДНК в деминерализованном костном матриксе и крошке	74
2.2.2.9 Измерение остаточного Ca^{2+} в деминерализованном костном матриксе и крошке	75
2.2.3 Методы исследования биологических свойств материалов	75
2.2.3.1 Анализ цитотоксического действия КФС на клеточные культуры	75

2.2.3.2 Анализ жизнеспособности клеток и степени их распластывания методом флуоресцентной микроскопии	76
2.2.3.3 Проточная цитотометрия.....	77
2.2.3.3.1 Измерение содержания кислых компартментов.....	77
2.2.3.3.2 Измерение потенциала митохондриальной мембраны	77
2.2.3.3.3 Измерение продукции внутриклеточных активных форма кислорода	77
2.2.3.4 Конфокальная микроскопия	78
2.2.3.4.1 Исследования цитотоксических и адгезивных свойств материалов	78
2.2.3.4.2 Исследование содержания кислых компартментов и митохондриального потенциала.....	79
2.2.3.5 Хирургические процедуры	79
2.2.3.6 Гистологический анализ	80
2.2.4 Статистический анализ.....	81
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	82
3.1 Исследование биосовместимости и биоинтеграции вариаций синтетических гидратированных кальций-фосфатных паст	82
3.1.1 Исследование цитотоксических свойств гидратированной кальций-фосфатной пасты, подвергшейся температурной обработке, <i>in vitro</i>	82
3.1.2 Исследование биосовместимости гидратированной кальций-фосфатной пасты, подвергшейся температурной обработке, <i>in vivo</i>	85
3.1.3 Исследование цитотоксических свойств гидратированной кальций-фосфатной пасты, полученной низкотемпературным синтезом, <i>in vitro</i>	87
3.1.4 Исследование биосовместимости и биоинтеграции гидратированной кальций-фосфатной пасты, полученной низкотемпературным синтезом, <i>in vivo</i>	91
3.2 Исследование биосовместимости и биоинтеграции <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> порошкообразных кальций-фосфатов-предшественников гидроксиапатита и их модификаций.....	92
3.2.1 Исследование цитотоксических свойств порошкообразных кальций-фосфатов – предшественников гидроксиапатита <i>in vitro</i>	92
3.2.2 Исследование биосовместимости порошкообразных кальций-фосфатов– предшественников гидроксиапатита <i>in vivo</i>	97
3.2.3 Исследование цитотоксических свойств и влияния на внутриклеточные процессы Sr-замещённого октакальций фосфата <i>in vitro</i>	100
3.2.4 Исследование биосовместимости и цитотоксических свойств Sr-замещённого октакальций фосфата <i>in vivo</i>	106
3.3 Повышение остеогенного потенциала дикальций фосфат дигидрата в композиции с деминерализованным костным матриксом	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ВЫВОДЫ	117
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	118

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121
БЛАГОДАРНОСТИ	153

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Биоматериал – материал, предназначенный для взаимодействия с биологическими системами с целью оценки, лечения, усиления или замены какой-либо ткани, органа или функции организма.

Биосовместимость – способность материала встраиваться в организм пациента, не вызывая местных или системных побочных эффектов, и индуцировать клеточную или тканевую реакцию, необходимую для достижения оптимального терапевтического эффекта.

Биологическая безопасность – состояние биоматериала при использовании по назначению в надлежащих условиях, при котором он не оказывает вредного воздействия на организм человека.

Остеокондуктивность – способность материала обеспечивать адгезию, пролиферацию и миграцию клеток на по своей поверхности.

Остеоиндуктивность – способность материала стимулировать дифференцировку клеток-предшественников в клетки костной ткани.

Остеогенность – способность материала напрямую обеспечивать клетки, которые будут производить костную ткань, включая примитивные мезенхимальные стволовые клетки, остеобласты и остециты.

Цитотоксичность – способность биоматериала вызывать наблюдаемые визуально или с помощью микроскопа эффекты от подавления роста клеток до их полного лизиса или растворения.

Цитотоксическое действие – любое повреждающее действие на клетки в культуре, включая снижение плотности посадки, лизис, подавление синтеза макромолекул, снижение пролиферации клеток и открепление клеток от субстрата.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

аГАп-НТ – аморфный гидроксиапатит, полученный при низкой температуре

амФК – аморфный фосфат кальция

ГАп – гидроксиапатит

гКФП – гидратированная кальций-фосфатная паста

гКФП-НТ – гидратированная кальций-фосфатная паста, полученная при низкой температуре

гКФП-ВТ – гидратированная кальций-фосфатная паста, полученная при высокой температуре

ДКФД – дикальций фосфат дигидрат

ДКМ – деминерализованный костный матрикс

КФС – кальций-фосфатные соединения

ОКФ – октакальций фосфат

РФА – рентгенофазовый анализ

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ВВЕДЕНИЕ

Возникновение дефектов костной ткани вследствие резекции крупных костных опухолей, несрастающихся переломов, заболеваний различной этиологии, а также аномалий развития скелета, вызванных генетическими нарушениями, являются одной из главных причин инвалидности и снижения качества жизни во всём мире [Zhang *и др.*, 2020]. Наличие перечисленных патологических процессов на сегодняшний день является актуальной проблемой общественного здравоохранения во всём мире и приводит к серьёзным экономическим убыткам [GBD 2019 Fracture Collaborators, 2021]. По статистике, в мире ежегодно выполняется 20 млн ортопедических операций, 70% из которых требуют использования костных имплантатов для заполнения костных дефектов [Lukina *и др.*, 2023]. Неблагоприятные последствия травм костной ткани общезначимы и выражаются как в прямых затратах на лечение и медико-санитарное обслуживание пациентов, так и в виде косвенных издержек, таких как снижение рабочей производительности вследствие утраты пациентами трудоспособности. Принимая во внимание увеличивающиеся продолжительность жизни и старение населения, можно утверждать, что число травм костной ткани и их негативных последствий будет только увеличиваться, что подчёркивает важность и необходимость совершенствования существующих подходов лечения.

Ограниченность регенеративного потенциала костной ткани приводит к необходимости использования различных имплантов для восстановления утраченного объёма кости, что особенно актуально для критически размерных дефектов, к которым относятся повреждения более 6-25 мм в длину (в зависимости от типа костной ткани), не способные к самостоятельному заживлению [Нои *и др.*, 2022]. Помимо этого, невозможность полноценной репарации костной ткани может быть связана с нарушением нормального течения регенеративных процессов вследствие коморбидных заболеваний (включая инфекционные), а также иммунного дисбаланса и подавления васкуляризации регенераторной ниши [Zhang *и др.*, 2020]. Вследствие этого разработка высокоэффективных биоматериалов для восстановления нормальной морфологии и полноценной функциональности костной ткани имеет высокую научную значимость и ценность для клинического применения.

На сегодняшний день в клинической практике применяются различные остеопластические материалы как природного, так и синтетического происхождения. При этом парадигмой современного материаловедения является создание автономных остеогенных материалов, способных стимулировать регенеративный процесс непосредственно «на себе» за счёт привлечения и дифференцировки клеток-

предшественников в клетки костной ткани и поддержания остеокластно-остеобластного баланса [Lu, Yu, Chen, 2018]. Такой материал не должен проходить стадию полной резорбции (утилизации), а должен подвергаться ремоделированию (перестройке) в организме реципиента и внедряться в кость с формированием персонифицированной костной ткани.

До сих пор среди всех материалов «золотым» стандартом остаются васкуляризованные аутографты, представляющие собой непосредственно вышеописанный автономный остеогенный материал. Однако ограниченность ресурсов организма пациента и дополнительная травматизация делает широкое применение аутографтов невозможным. В свою очередь, для алло- и ксенографтов возникает проблема необходимости очистки матрикса от антигенных детерминат с одновременным сохранением структуры матрикса. В связи с этим среди остеопластических материалов наибольшее распространение получило использование синтетических материалов, прежде всего, на основе кальций-фосфатных соединений (КФС). К преимуществам КФС в сравнении с другими видами остеопластических материалов относятся простота и дешевизна их синтеза, возможность получения материалов с различными прочностными характеристиками и разнообразной геометрией. Помимо этого, благодаря их сходству с минеральным компонентом костной матрикса КФС обладают остеокондуктивными (т.е. способными обеспечивать адгезию, пролиферацию и миграцию клеток на по своей поверхности) и остеоиндуктивными (т.е. способными стимулировать дифференцировку клеток-предшественников в клетки костной ткани) свойствами и, как следствие, способны стимулировать регенерацию костной ткани по месту дефекта, что подтверждается многочисленными исследованиями [Tang *и др.*, 2018]. Однако вследствие недостатка знаний относительно влияния физико-химических свойств КФС на их биосовместимость, т.е. способность материала встраиваться в организм пациента, не вызывая местных или системных побочных эффектов, и индуцировать клеточную или тканевую реакцию, необходимую для достижения оптимального репаративного эффекта [Williams, 2008], материалы на их основе проявляют нестабильные эффекты в организме: от регенерации костной ткани до отторжения материала организмом. Исследование специфики биосовместимости КФС и разработка на основе полученных знаний новых высокоэффективных остеопластических материалов имеет неоспоримую научную и практическую значимость.

Получившие широкое распространение в клинической практике материалы на основе кальций-фосфатов, полученных высокотемпературным синтезом ($>1000^{\circ}\text{C}$), обладают необходимыми прочностными характеристиками, однако не способны

обеспечивать регенерацию костной ткани. В связи с этим одним из рассматриваемых подходов увеличения биосовместимости КФС является их синтез в условиях, приближенных к физиологическим, в частности при низких температурах (20-37°C). Однако биосовместимость подобных материалов остается во многом неизученной.

Таким образом, на основе всего вышесказанного целью работы являлось исследование клеточных и тканевых аспектов биосовместимости кальций-фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом.

Были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать специфику биологической реакции клеток и тканей на пастообразные кальций-фосфатные ГАп-материалы, полученные методом высоко- и низкотемпературного синтеза в условиях *in vitro* и *in vivo*;

2. Исследовать специфику биологической реакции клеток и тканей на предшественники ГАп – дигидрат дикальцийфосфата (ДКФД) и октакальций фосфат (ОКФ), а также самого ГАп, полученных методом низкотемпературного синтеза в форме порошков в условиях *in vitro* и *in vivo*;

3. Исследовать влияние частичной замены Ca^{2+} на Sr^{2+} в структуре ОКФ на его цитотоксические и остеокондуктивные свойства в условиях *in vitro* и *in vivo*;

4. Разработать подход повышения биосовместимости КФС, полученных методом низкотемпературного синтеза, в составе композитных материалов.

Научная новизна работы

В работе показано, что уменьшение содержания кристаллической фазы в пастообразном гидратированном ГАп, полученным низкотемпературным синтезом, улучшает его биосовместимость на клеточном уровне и повышает остеокондуктивные свойства в организме. Установлено, что цитотоксический эффект *in vitro* различных КФС – предшественников ГАп, полученных низкотемпературным синтезом, более выражен для зависимых от прикрепления клеток, что может быть связано с их адгезией к клеточной поверхности. ДКФД и ОКФ проявляют признаки биосовместимости в модели гетеротопической имплантации крысам *in vivo*, но не вызывают значимых остеогенных эффектов. Введение ионов Sr^{2+} в структуру ОКФ приводит к снижению его цитотоксичности *in vitro*, повышению остеокондуктивности и биологической безопасности *in vivo*. Сочетание ДКФД с деминерализованным костным матриксом обеспечивает придание остеогенных свойств полученному композиту. Полученные результаты расширяют представления о потенциале влияния кальций-фосфатных соединений,

полученных низкотемпературным синтезом, на процессы биоинтеграции синтетических материалов и репаративно-регенеративных процессов остеогенеза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Предложенные подходы увеличения биосовместимости кальций-фосфатных соединений путём их синтеза при физиологической температуре ($\leq 37^\circ\text{C}$), а также частичной замены ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} являются основой для разработки новых остеопластических материалов. Помимо этого, разработанный биомиметический композитный материал на основе дигидрата дикальцийфосфата и деминерализованного костного матрикса может быть предложен в качестве перспективного остеопластического материала с автономным остеогенным эффектом.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием междисциплинарного подхода на стыке материаловедения, биофизики, клеточной биологии и физиологии, а также на основе анализа полученных множеством иных исследователей и коллективом лаборатории результатов. Для физико-химического анализа структуры и состава изучаемых материалов использовали методы рентгенофазового анализа, ИК-спектроскопии, микрокомпьютерной томографии и сканирующей электронной микроскопии. Биосовместимость материалов *in vitro* и *in vivo* исследовали такими методами, как культивирование клеток, проточная цитометрия, конфокальная и флуоресцентная микроскопия, спектрофото- и флуориметрия, работами с экспериментальными животными (методы гетеротопической имплантации лабораторным животным), дифференциальным гистохимическим анализом, световой микроскопией, цифровой обработкой микроскопических изображений, а также статистическими методами обработки данных. Эксперименты выполнены на базе Лаборатории биомедицинских технологий, Лаборатории тканевой инженерии и Лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН, а также Лаборатории композиционных материалов №20 ИМЕТ РАН и Лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН. В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования ИТЭБ РАН и ИМЕТ РАН.

Основные научные положения, выносимые на защиту:

1. Использование низкотемпературного (20°C) синтеза для получения пастообразного гидратированного ГАп-материала приводит к увеличению его способности поддерживать жизнеспособность клеток *in vitro* и повышению остеокондуктивных свойств *in vivo*, по сравнению с пастообразным гидратированным ГАп-материалом, полученным высокотемпературным (120°C) синтезом;

2. Цитотоксические свойства негидратированных КФС, полученных низкотемпературным синтезом, более выражены по отношению к зависимым от прикрепления клеток; при этом наиболее выраженные показатели биологической безопасности и остеокондуктивности в условиях *in vitro* и *in vivo* проявляет дигидрат дикальцийфосфата;

3. Замещение ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} в структуре октакальций фосфата позволяет значительно снизить степень цитотоксичности *in vitro* и повысить биологическую безопасность и остеокондуктивность *in vivo*;

4. Создание биомиметических композитных материалов путём комбинации низкотемпературных предшественников ГАп с деминерализованным костным матриксом позволяет повысить остеоиндуктивные и остеогенные свойства КФС.

Достоверность результатов исследования подтверждается использованием сертифицированного научного оборудования, программного обеспечения, а также передовых методик проведения экспериментов в области клеточной биологии, работы с экспериментальными животными и цифрового анализа гистологических изображений. Статистическая значимость полученных результатов подтверждена использованием репрезентативного и воспроизводимого материала с применением методов параметрической и непараметрической статистики при анализе данных.

Апробация результатов исследования. Основные результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов, «Симбиоз – России-2017» (Казань, 2017), Третьем междисциплинарном молодежном научном форуме с международным участием «Новые материалы (Москва, 2017), Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2018), IV и V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019, 2022), III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2021) и других всероссийских и международных конференциях.

Личный вклад автора. Все результаты, представленные в диссертации, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Автор диссертационной работы совместно с научным руководителем участвовал в формулировании целей и задач исследования, планировал экспериментальную работу и анализировал полученные результаты. Автору диссертационной работы принадлежит ключевая роль в выполнении экспериментов, обработке полученных данных, представлении и апробации результатов

исследований на научных конференциях и подготовке научных публикаций по выполненной работе.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано более 20 работ, в том числе 8 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, Web of Science и Scopus, более 10 тезисов докладов на научных конференциях всероссийского и международного уровней и 1 патент на изобретение РФ.

Связь работы с научными программами.

Диссертационная работа выполнена в рамках Гос.задания ИТЭБ РАН (темы НИР №№ АААА-А18-118040990028-2, 122012000066-8 и 124013000613-9) и поддержана грантами Российского научного фонда №21-73-20251 «Влияние структурных и фазовых трансформаций кальцийфосфатных соединений на механизмы биоинтеграции или отторжения материалов, предназначенных для регенерации костной ткани» (руководитель – Баринов С.М.) и №22-73-00215 «Биоинспирированные минерал-полимерные материалы для направленной регенерации костной ткани» (руководитель – Тетерина А.Ю.), Фонда содействия инновациям в рамках Программ «Развитие» №221АГР/19286 «Высокоэффективные остеопластические материалы на основе ксеногенных матриц для восстановительной хирургии костной ткани» (руководитель – Сенотов А.С.) и «У.М.Н.И.К» №13194ГУ/2018 «Разработка гибридного остеопластического материала, предназначенного для малоинвазивных хирургических вмешательств» (руководитель – Минайчев В. В.), а также Совета по грантам Президента Российской Федерации в рамках Стипендии Президента РФ (СП-1275.2019.4).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структурно-функциональная организация костной ткани

Костная ткань (КТ) представляет собой тип соединительной ткани, на 10% состоящей из клеток и на 90% – из специализированного внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ костной ткани представляется собой композиционный материал, состоящий из плотноупакованных коллагеновых фибрилл (40%) и импрегнированных в них и между ними неорганических кристаллов гидроксиапатита (ГАп) (60%) [Zimmermann, Ritchie, 2015]. Кость как орган выполняет множество функций в организме, и помимо поддержки и защиты мягких тканей и внутренних органов, совместно с мышцами обеспечивает поддержание позы и перемещение организма в пространстве, а также служит местом хранения костного мозга и является главным депо кальция (Ca^{2+}) и фосфора (P).

Кость является высокодинамичной структурой, постоянно перестраивающейся благодаря процессу ремоделирования, в ходе которого старая КТ постоянно резорбируется и замещается новой. На клеточном уровне в составе КТ можно выделить 4 типа клеток: остеобласты, остециты, остеокласты и покровные (выстилающие) клетки. Помимо вышеперечисленных «классических» клеток костной ткани в недавнем исследовании была выделена новая популяция клеток, происходящих из остеокластов, получивших название остеоморфов [McDonald *и др.*, 2021].

Остеобласты (ОБ) составляют 4-6% от общего числа резидентных клеток КТ и представляют собой небольшие одноядерные клетки кубовидной формы с хорошо развитым шероховатым эндоплазматическим ретикуломом и аппаратом Гольджи, и обеспечивают как неосинтез органической части кости, так и ее минерализацию [Capulli, Paone, Rucci, 2014];

ОБ образуются из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [Robert *и др.*, 2020]. Коммитирование MSC в остеогенном направлении происходит посредством экспрессии генов костных морфогенетических белков (BMPs; bone morphogenetic proteins) и белков-членов Wnt-пути [Wei *и др.*, 2019]. Центральную роль в остеобластной дифференцировке играет экспрессия генов, кодирующих runt-ассоциированный транскрипционный фактор 2 (RUNX2), Dlx5 и транскрипционный фактор Sp7, также известный как остерикс (Osx) [Capulli, Paone, Rucci, 2014]. Мастер-геном дифференцировки ОБ является *Runx2*, обеспечивающий активацию генов характерных для остеобластов (*Coll1A1*, *ALPS*, *BSP*, *BGLAP* и *OCN*) [Fakhry *и др.*, 2013].

После коммитирования MSC в остеогенном направлении образующиеся клетки проходят три стадии развития:

1. пролиферативная;
2. синтеза внеклеточного матрикса и его созревания;
3. минерализации внеклеточного матрикса (Рис. 1) [Stein, Lian, 1993].

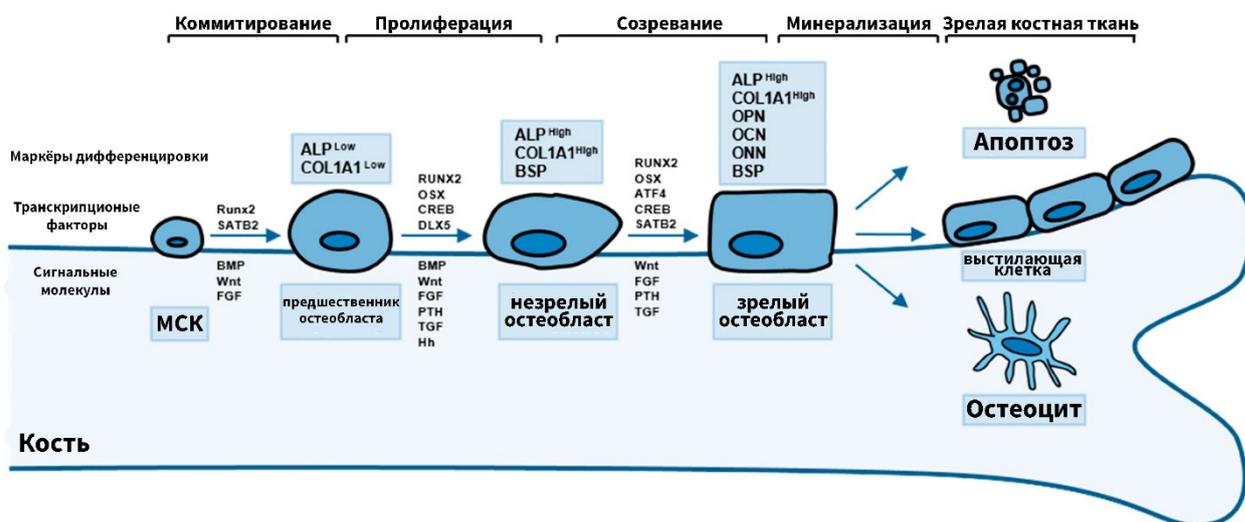


Рисунок 1 – Схема дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты [адаптировано на основании Amarasekara, Kim, Rho, 2021]

Помимо построения и имнерализации ВКМ, важной функцией ОБ, является регуляция дифференцировки и функции резорбирующих костную ткань остеокластов (ОК) и, следовательно, контроль процесса ремоделирования костной ткани в целом. Данная регуляторная функция обеспечивается за счет продукции двух основных цитокинов: макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) [Amarasekara, Yu, Rho, 2015], а также активатора рецептора ядерного фактора каппа В (RANK; receptor activator of nuclear factor κ B) и его лиганда (RANKL)

Клетки, выстилающие кость (также называемые клетками костной выстилки, ККВ) представляют собой покоящиеся ОБ плоской формы, которые покрывают поверхность кости, где не происходит ни резорбции, ни формирования костной ткани [Miller *и др.*, 1989]. При этом данные клетки могут вновь приобретать свою секреторную активность, увеличивая свой размер и принимая кубическую форму [Donahue *и др.*, 1995].

Наиболее известной функцией ККВ клеток является формирование функционального барьера между костью и костным мозгом за счет образования щелевых контактов данных клеток между собой и ОЦ [Miller *и др.*, 1989]. Помимо формирования данного функционального барьера ККВ участвуют в ремоделировании костей в нормальных физиологических условиях, входя в состав базисных многоклеточных единиц (или костных ремоделирующих единиц) [Bolamperti, Villa, Rubinacci, 2022]. Данные клетки препятствуют прямому взаимодействию между ОК и костным матриксом, когда не должна

происходить резорбция кости. Считается, что во время ремоделирования ККВ обеспечивают начальную стадию деградации матрикса, предшествующую рекрутированию ОК в участки резорбции [Hauge *и др.*, 2001]. Они также участвуют в дифференцировке ОК, продуцируя OPG и RANKL [Andersen *и др.*, 2009]. Кроме того считается, что после активной остеокластной резорбции ККВ осуществляют «зачистку» лакун Хаушипа, а также синтезируют тонкий слой коллагенового матрикса, который может служить матрицей для последующей активности ОБ [Everts *и др.*, 2002].

Остеоциты (ОЦ) составляют 90–95% всех костных клеток в зрелой костной ткани и являются наиболее многочисленными и долгоживущими клетками, продолжительность жизни которых достигает 25 лет [Franz-Odenaal, Hall, Witten, 2006]. В отличие от периодически синтезирующих и резорбирующих костную ткань ОБ и ОК, ОЦ находятся в костной ткани перманентно [Rocheffort, Pallu, Benhamou, 2010]. ОЦ расположены в лакунах, окруженных минерализованным костным матриксом, при этом они имеют длинные (до 60 мкм) ветвящиеся отростки, соприкасающиеся с отростками соседних остеоцитов с помощью десмосомо-подобных структур [Komori, 2010]. При этом, дендритная морфология встроенных ОЦ различается в зависимости от типа кости: для трабекулярной КТ свойственна более округлая форма тела ОЦ, для кортикального слоя – вытянутая [Pfeilschifter *и др.*, 1990].

ОЦ образуются путем 4-этапной дифференцировки ОБ: (1) остеоид-остеоцит, (2) преостеоцит, (3) молодой остеоцит и (4) зрелый остеоцит [Erlebacher *и др.*, 1998]. После погружения в минерализованный костный матрикс и окончательного созревания ОЦ, в них полностью подавляется экспрессия остеобластных маркеров ОБ (OCN, BSP1, коллагена I типа и ALP), а также появляется высокий уровень экспрессии маркеров остеоцитов (DMP1 и склеростина) [Mikuni-Takagaki *и др.*, 1995; Poole *и др.*, 2005]. Находящиеся в крошечных канальцах цитоплазматические отростки ОЦ образуют мощную лакуноканаликулярную систему, пронизывающую всю костную ткань [Florencio-Silva *и др.*, 2015]. Помимо других ОЦ, цитоплазматические отростки соединены контактами с цитоплазматическими отростками ОБ и ККВ, облегчая межклеточный транспорт малых сигнальных молекул, таких как простагландины и оксид азота (NO) [Florencio-Silva *и др.*, 2015]. В лакуноканаликулярной системе остеоциты действуют как механосенсоры, поскольку их взаимосвязанная сеть способна обнаруживать механические давления и нагрузки, тем самым способствуя адаптации КТ к ежедневным механическим нагрузкам [Rocheffort, Pallu, Benhamou, 2010]. Таким образом, ОЦ «дирижируют» процессом

ремоделирования КТ посредством регуляции активности ОБ и ОК [Dallas, Prideaux, Bonewald, 2013].

Остеокласты (ОК) представляют собой многоядерные клетки, обладающие уникальной способностью растворять костный матрикс посредством секреции различных молекул. ОК являются по сути костными макрофагами и образуются путем слияния мононуклеаров гематопоэтической линии моноцитов/макрофагов под действием различных цитокинов и ростовых факторов (таких как M-CSF и др.), секретируемых ОБ, ОЦ, а также остеопрогениторными мезенхимальными и стромальными клетками [Boyse *и др.*, 1999; Crockett *и др.*, 2011; Takayanagi, 2007].

Ключевым фактором остеокластогенеза является RANKL, экспрессирующийся ОБ и стромальными клетками. Образование ОК индуцируется после связывания RANKL со своим рецептором RANK на предшественниках ОК [Sodek, McKee, 2000]. При этом остеокластогенный потенциал может различаться в зависимости от локализации КТ: например, ОК трубчатых костей образуются быстрее, чем в челюсти, что может быть связано с клеточным составом костного мозга, специфичного для конкретной КТ [Souza Faloni de *и др.*, 2011]. Помимо резорбции костной ткани ОК также выполняют ряд других функций, включая экспрессию кластокинов, контролирующих ОБ во время цикла ремоделирования кости и прямое регулирование ниши гемопоэтических стволовых клеток [Charles, Aliprantis, 2014]. Эти данные свидетельствуют о том, что ОК являются не только клетками, резорбирующими кость, но и источником цитокинов, влияющих на активность других клеток.

Остеоморфы (ОМ) являются альтернативной ветвью развития ОК и представляют собой дочерние клетки, образующиеся в результате деления RANKL-стимулированных ОК [McDonald *и др.*, 2021]. Считается, что в нормальных физиологических условиях крупные ОК имеют короткую продолжительность жизни и в конечном итоге подвергаются апоптозу [Manolagas, 2000]. Однако, согласно недавнему исследованию *in vivo*, остеокласты подвергаются клеточному делению вместо апоптоза с образованием ОМ. Кроме того, это исследование показало, что спонтанный апоптоз ОК гораздо менее распространен, чем деление *in vivo* [Huang *и др.*, 2023].

Данные секвенирования РНК ОМ показали, что они отличаются от ОК и макрофагов на уровне транскрипции. Так ОМ экспрессируют ряд неканонических генов ОК, таких как *Fbxo7*, экспрессия которых до этого не наблюдалась в костной ткани. Предполагается, что ОМ, имея большую подвижность по сравнению с ОК, способны обеспечивать более быструю миграцию ОК. При этом при активации RANKL ОМ способны обратно сливаться

в ОК, таким образом, обеспечивая их рециркуляцию. Ингибирование RANKL блокировало эту клеточную рециркуляцию и приводило к накоплению ОМ в КТ, а удаление ингибиторов (таких как OPG:Fc) способствовало обратному слиянию ОМ в ОК, что указывает на центральную роль RANKL в процессе образования ОК из ОМ [McDonald *и др.*, 2021]. Таким образом, деление ОК и слияние ОМ способствуют эффективной регуляции костного метаболизма.

Таким образом, КТ представляет собой сложный орган, нормальное функционирование которого зависит от взаимодействия различных типов клеток и множества факторов, обеспечивая их согласованную работу.

1.2 Строение внеклеточного матрикса костной ткани

Минерализованный ВКМ является уникальной особенностью позвоночных животных. Происхождение процесса биоминерализации восходит к позднему докембрийскому периоду после того, как тектоническая деятельность вызвала заметное увеличение содержания растворимых минералов в морской воде [Wagner, Aspenberg, 2011]. Принято считать, что у морских организмов сначала развился примитивный экзоскелет, состоящий из минералов карбоната кальция и/или фосфата кальция [Gilbert *и др.*, 2022; Wagner, Aspenberg, 2011], а в процессе эволюционной адаптации скелетные ткани были интернализированы, что проложило путь к появлению более крупных организмов.

ВКМ костной ткани представляет собой композитный материал, состоящий на 50–70% из неорганических минералов и на 20-40 % из органических молекул и менее чем на 3% из липидов и воды [Clarke, 2008]. Подобное сочетание органической армирующей основы и неорганического минерального наполнения обеспечило формирование уникальной структуры кости, по прочностным характеристикам превосходящую бетон (модуль Юнга колеблется от $1,38 \cdot 10^3$ до $1,94 \cdot 10^3$ кГ/мм²) [Карлов, Шахов, 2001]. При этом важно отметить, что точный состав ВКМ зависит от множества факторов, включая возраст, пол, анатомическое расположение кости или заболевания КТ [Boskey, 2013].

Минеральная составляющая КТ очень похожа на гидроксипатит (ГАп) и придает кости механическую жёсткость и несущую способность. ГАп КТ отличается от стехиометрического состава $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, и содержит значительное количество примесей вследствие ионного замещения такими ионами как Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , цитрат, HPO_4^{2-} , карбонат (CO_3^{2-}), Cl^- , F^- и т.д. [Eliaz, Metoki, 2017]. Эластичность и гибкость кости обеспечивают органические компоненты, в состав которых входят такие структурные белки как коллаген и фибронектин [Nair *и др.*, 2013]. Органическая фаза также включает другие

неколлагеновые белки, выполняющих функцию организации матрикса и обеспечивающие его нормальную минерализацию [Boskey, 2013]. Небольшое количество липидов имеет важное значение для передачи сигналов клетками и обеспечения потока ионов [Clarke, 2008]. Также в костном матриксе имеются декорин, бигликан, люмикан и остеоадерин, представляющие собой небольшие богатые лейцином протеогликаны, а также сывороточные белки [Le *и др.*, 2017].

Основным фибриллярным белком костной ткани является коллаген I типа [Oosterlaken, Vena, de With, 2021]. Он представляет собой гетеротримерную молекулу, состоящую из двух левосторонних $\alpha 1$ -цепей и одной $\alpha 2$ -цепи. В качестве третичной структуры эти левосторонние цепи принимают правостороннюю тройную спираль. Каждая α -цепь имеет характерную повторяющуюся единицу [Gly-X-Y], причем X и Y в основном представляют собой пролин (Pro) и 4-гидроксипролин (4-Hyp) соответственно. Последовательность Gly-Pro-Hyp составляет около 12% от всех аминокислот в молекуле коллагена [Soroushanova *и др.*, 2019].

Структура коллагена I типа представлена на рисунке 2. Молекулы коллагена имеют длину ≈ 300 нм и ширину $\approx 1,5$ нм. Они спонтанно собираются в фибриллы и волокна, которые могут достигать 1 см в длину и 1 мкм в диаметре, в зависимости от типа ткани.

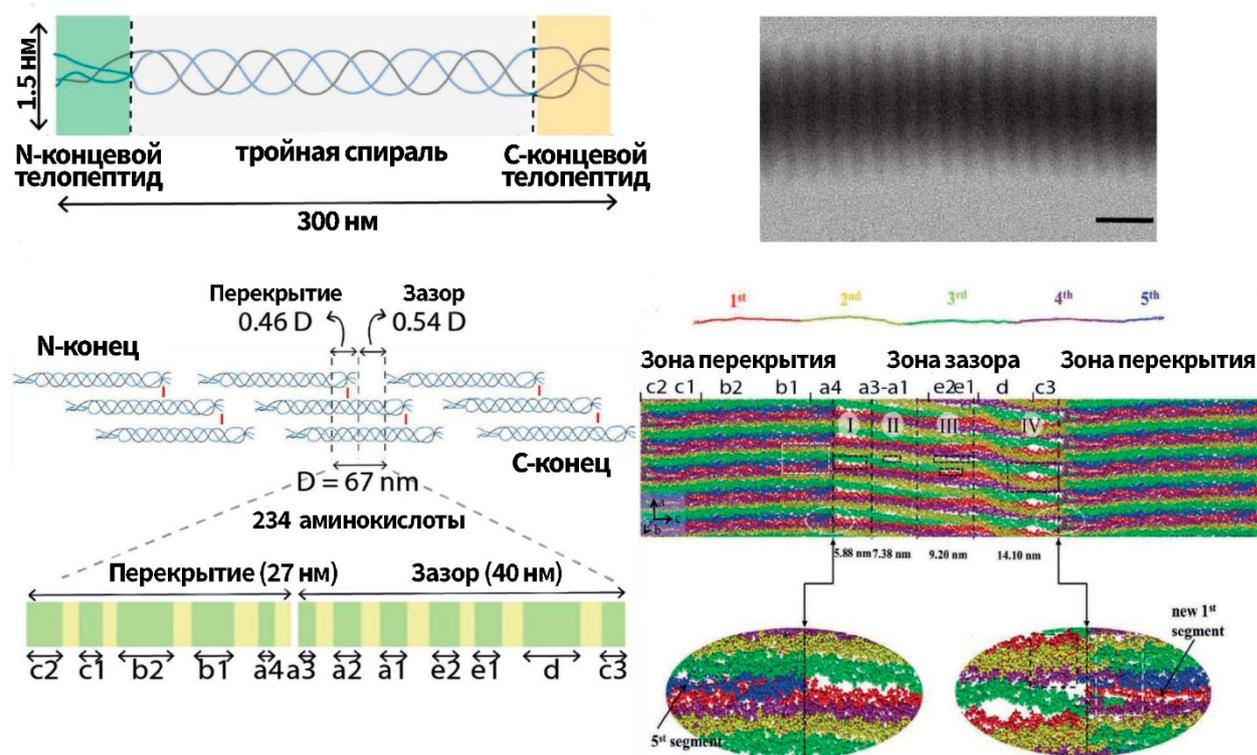


Рисунок 2 – Структура коллагена I типа [адаптировано на основании Oosterlaken, Vena, de With, 2021]

Коллагеновые фибриллы состоят из более мелких строительных блоков, называемых микрофибриллами, образованными пятью молекулами тропоколлагена, расположенными со смещением 67 нм между соседними молекулами [Shoulders, Raines, 2009]. Их организация в виде квазигексагональной элементарной ячейки с осевой длиной 67 нм была подтверждена картированием высокого разрешения в сочетании с кристаллографическими данными и моделированием [Orgel *и др.*, 2006]. Квазигексагональная структура сохраняется на протяжении всей микрофибриллы, и каждая элементарная ячейка содержит молекулярные сегменты из четырех молекул тропоколлагена и область разрыва.

Коллагеновые фибриллы могут связываться в волокна. При этом ориентация, в которой фибриллы выравниваются внутри волокон, обуславливает различную ультраструктуру, микроархитектонику и механические свойства различных гистотипов костной ткани. В зависимости от организации коллагеновых волокон КТ можно разделить на 2 вида: грубоволокнистую и пластинчатую (Рис. 3).

Грубоволокнистая костная ткань представляет собой незрелую ткань и характерна для эмбрионов, новорожденных, а также образуется при заживлении переломов. Данная ткань представляет собой матрицу из переплетенных грубых коллагеновых волокон и хаотично распределённых остецитов. Она менее организована, чем пластинчатая кость и замещается ею у детей в возрасте 2-3 лет.

Пластинчатая кость представляет собой зрелую кость, которая возникает в результате ремоделирования грубоволокнистой КТ. Пластинчатая КТ (Рис. 3) характеризуется строго ориентированными коллагеновыми волокнами. Коллагеновые волокна в пластинчатой КТ расположены в виде массивов параллельных тяжей, которые последовательно меняют ориентацию, образуя «фанероподобную» структуру [Reznikov, Shahar, Weiner, 2014]. Чередующаяся ориентация массивов коллагена приводит к значительно более высокой прочности пластинчатой кости по сравнению с грубоволокнистой КТ [Clarke, 2008].

Пластинчатая КТ в свою очередь делится на два типа в зависимости от организации коллагеновых волокон: кортикальную (компактную) и трабекулярную (губчатую) (Рис. 3).

Кортикальная кость составляет порядка 80% от всей массы скелета и состоит из гаверсовой системы, которая состоит из множества плотно упакованных остеонов, представляющих собой образованные пластинчатой костной тканью узкие, вставленные друг в друга цилиндрические пластины (ламеллы), шириной и длиной 200 и 1000 мкм, соответственно. Каждый остеон состоит из ламелл, числом от 4 до 20 и шириной 3-7 мкм [Смирнов, Румянцев, 2014]. Центральный канал остеона содержит клетки, сосуды и нервы,

а каналы, соединяющие остеоны, называются каналами Фолькмана. Модуль Юнга для кортикальной кости составляет порядка 17 ГПа, и она имеет более высокую прочность на сжатие, чем на растяжение, и прочнее в продольном направлении, чем в поперечном [Carter, Hayes, 1976].

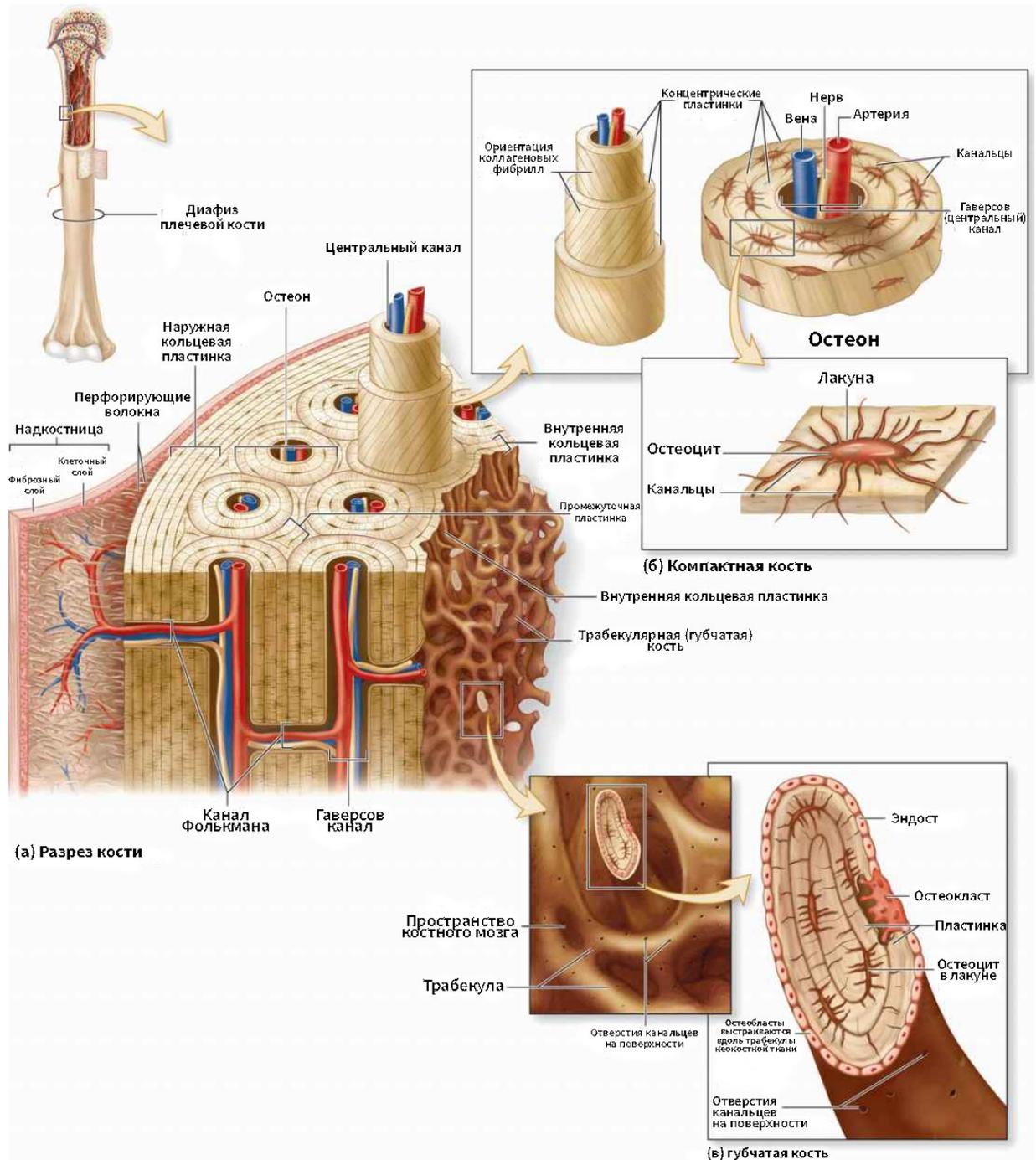


Рисунок 3. – Строение трабекулярной и кортикальной пластинчатой костной ткани [адаптировано на основании Mescher, A. L., 2018]

Трабекулярная КТ составляет около 20% массы скелета и находится в эпифизах и метафизах длинных костей, а также внутри плоских и мелких костей. Она имеет разветвлённую сеть мелких анастомозирующих костных пластинок, называемых трабекулами, ориентированных в направлении, зависящем от внешней нагрузки. Трабекулярная кость имеют модуль Юнга около 1 ГПа, который может варьировать в зависимости от анатомического расположения и возраста [Lacroix, 2019]. Губчатая кость обладает уникальной способностью противостоять большой сжимающей нагрузке при минимальной массе. Такое поглощение энергии допускает деформацию сжатия более 50% [Linde, Hvid, Pongsoipetch, 1989]. При этом, как и в бетоне, армированном фиброй, поведение трабекулярной кости при растяжении хуже.

1.3 Механизм минерализация костного матрикса

Процесс минерализации обеспечивает необходимую твёрдость и прочность КТ и представляет собой клеточно-опосредованный процесс, центральную роль в котором играют ОБ. Минерализация костей включает две фазы: первичную и вторичную минерализацию.

Первичная минерализация связана с секрецией ОБ во внеклеточное пространство матриксных везикул (МВ), после чего минеральная плотность кости постепенно увеличивается во время вторичной минерализации. МВ впервые были обнаружены в хрящах и костях с использованием методов электронной микроскопии. Они представляют собой подгруппу внеклеточных везикул, которые синтезируются клетками минерализованных тканей, прежде всего ОБ и одонтобластами [Bottini *и др.*, 2018]. Ультраструктурно они представляют собой электронно-плотные структуры, размер которых варьирует от 10 до 400 нм.

МВ способны накапливать кальций и неорганический фосфат, за счёт наличия в своей плазматической мембране необходимых переносчиков и ферментов [Azoidis, Cox, Davies, 2018; Bakhshian Nik, Hutcheson, Aikawa, 2017]. Благодаря ним внутри МВ создаётся необходимая для формирования кальций-фосфатных кристаллов и их последующего роста микросреда.

Образующиеся внутри МВ КФС осаждаются в виде игольчатых кристаллов ГАп ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), рост которых в конечном итоге и разрушает их мембрану [Bakhshian Nik, Hutcheson, Aikawa, 2017]. При просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) эти кристаллы имеют форму спикулы или лентовидный структурный профиль шириной примерно 25 нм, высотой 10 нм и длиной 50 нм [Hasegawa *и др.*, 2017]. Впоследствии их

рост может продолжаться в экстравезикулярном пространстве с образованием более стабильных кристаллов или распространяться уже на коллагеновых фибриллах [Anderson, 2003; Millán, 2013; Pan и др., 2010].

Биогенез матричных везикул может происходить разными путями, включающий эктосомный и экзосомные пути, а также образование апоптотических тел (Рис. 4).

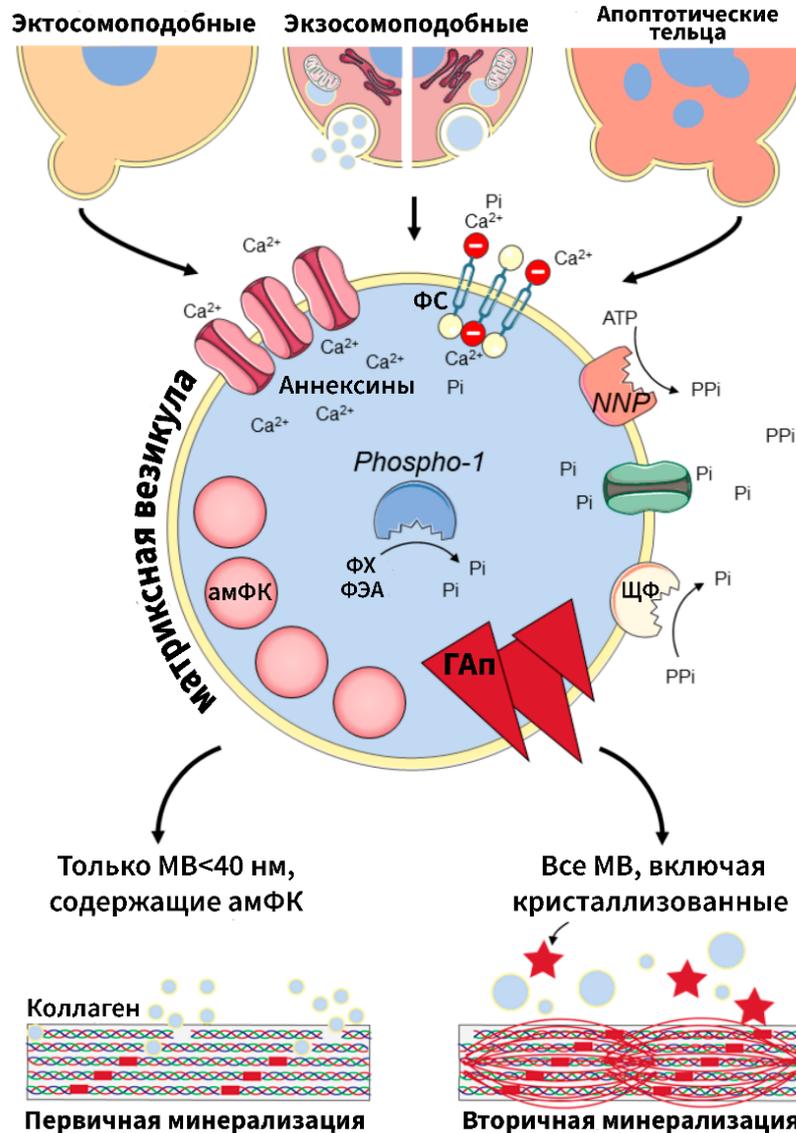


Рисунок 4 – Предполагаемый механизм биогенеза матричных везикул и этапы минерализации коллагена [адаптировано на основании Ansari *и др.*, 2021]

Эктосомоподобный путь образования матричных везикул заключается в их отпочковывании от плазматической мембраны минерализующих клеток [Anderson, 2003; Bottini *и др.*, 2018]. Чтобы иметь возможность накапливать кальций и неорганический фосфат, мембраны этих МВ имеют белки, связанные с минерализацией.

Вторым относительно недавно обнаруженным механизмом образования МВ является процесс, аналогичный образованию экзосом [Iwayama *и др.*, 2019; Pei *и др.*, 2018;

Tang *и др.*, 2020]. Данный процесс был впервые описан Boonrungsiman и соавторами, обнаружившими транспорт ионов кальция и фосфата из митохондрий (МХ) во внутриклеточные везикулы [Boonrungsiman *и др.*, 2012]. Эти МХ, вероятно, снабжаются кальцием и фосфатом из ЭПР и затем в них происходит зарождение аморфного фосфата кальция (амФК) [Tang *и др.*, 2020]. Содержащие амФК митохондрии сливаются с лизосомами, которые становясь аутолизосомами, подвергаясь митофагии [Pei *и др.*, 2018; Tang *и др.*, 2020]. Внутри лизосомального компартмента мембранные компоненты МХ деградируют, и в аутолизосомах высвобождается амФК, который посредством экзоцитоза транспортируется во внеклеточное пространство в виде МВ [Pei *и др.*, 2018]. Благодаря кислой среде внутри лизосом кристаллизация амФК не происходит [Iwayama *и др.*, 2019]. Таким образом, лизосомы, по-видимому, выполняют роль внутриклеточных транспортеров МВ, содержащих амФК, к плазматической мембране. Это подтверждается также тем фактом, что на ранних стадиях дифференцировки ОБ наблюдается вакуолизация МХ, что, вероятно, приводит к образованию их МВ [Iwayama *и др.*, 2019; Tang *и др.*, 2020]. Однако до сих пор не показано высвобождение данных экзосомоподобных МВ из родительской клетки и не идентифицированы их отличия от эктосомоподобных МВ.

Для экзосомо- и эктосомоподобных МВ характерны общие черты организации [Ansari *и др.*, 2021]. В мембрану данных МВ встроены различные ферменты и транспортёры, обеспечивающие увеличение внутри везикул концентрации ионов кальция и фосфатов до уровней необходимых для образования кальций-фосфатных кристаллов [Bhadada, Rao, 2021].

Транспорт ионов Ca^{2+} в МВ осуществляется благодаря белкам аннексинам. Аннексин А5, который может прочно связываться с фосфатидилсерином, увеличивает проницаемость МВ для кальция [Wuthier, Lipscomb, 2011]. Однако функция аннексинов, по-видимому, не имеет решающего значения для минерализации. Об это свидетельствуют исследования, в которых показано, что развитие кости не нарушено у мышей с нокаутом генов аннексина А5 и А6 [Belluoccio *и др.*, 2010].

Повышение концентрации фосфора внутри МВ осуществляется внутривезикулярными и внеклеточными способами [Bhadada, Rao, 2021]. Внутривезикулярная генерация фосфат-ионов PO_4^{3-} (Pi) осуществляется за счет ферментативного действия фосфоэтанолмин/фосфохолин фосфатазы-1 (PHOSPHO1), который генерирует Pi из фосфатидилхолина и фосфоэтаноламина. Приток в везикулы Pi из внеклеточного пространства, обеспечивается активностью тканенеспецифичной щелочной фосфатазы (TNAP) и нуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы типа-1 (NPP-

1). TNAP гидролизует неорганический пирофосфат (PPi), ингибирующий образование ГАп. В свою очередь NPP1 гидролизует внеклеточные нуклеотиды (такие как АТФ) до пирофосфата, косвенно обеспечивая новый источник фосфата для МВ за счет последующего действия TNAP [Yadav *и др.*, 2016]. Однако, поскольку пирофосфат действует как ингибитор минерализации, считается, что TNAP и NNP-1 контролируют соотношение пирофосфат/неорганический фосфат, которое необходимо для физиологической минерализации матрикса [Millán, 2013]. Транспорт внеклеточных форм Pi внутрь везикул осуществляется благодаря деятельности Na/Pi-котранспортеров.

Минерализация также напрямую связана с апоптозом. В частности, в эпифизарных пластинках, где гибель терминально дифференцированных хондроцитов приводит к образованию апоптотических телец [Kirsch *и др.*, 1997]. Также апоптотические тельца (АпТ) считаются важными инициаторами кальцификации сосудов [Boraldi, Lofaro, Quaglino, 2021]. В отличие от эктосомоподобных МВ, апоптотические МВ накапливают Ca²⁺ на внешней поверхности мембраны, за счет связи с экстернализированным фосфатидилсерином [Wu, Genge, Wuthier, 2008]. Кроме того, апоптотические тельца также, по-видимому, косвенно влияют на минерализацию, усиливая ЩФ и ингибируя воздействие NNP-1 на мембраны хондроцитов эпифизарной пластинки, что приводит к увеличению концентрации свободного Pi, участвующего в минерализации [Yuan *и др.*, 2019]. В совокупности, все МВ вносят вклад в минерализацию матрикса независимо от пути их биогенеза, т.к. обладают всеми необходимыми свойствами для накопления Ca²⁺ и Pi.

Несмотря на тот факт, что ясного понимания механизма минерализации до сих пор не существует, в настоящее время самой распространённой является теория, согласно которой минерализация происходит во внеклеточном матриксе под контролем ОБ.

Процесс минерализации можно рассматривать как ряд нескольких последовательных процессов (Рис. 5):

1. Первичная минерализация костной ткани начинается с зарождения амФК внутри МВ. Непосредственно амФК представляет собой гранулы неправильной и/или сферической формы, на которых происходит постепенное зарождение кристаллов ГАп [Bonjour, 2011; Chaudhary *и др.*, 2016; Hasegawa, 2018].

2. Далее МВ транспортируются в зону зазора коллагеновых фибрилл. На сегодняшний день считается, что ключевую роль в процессе взаимодействия МВ с коллагеновым матриксом играет строение коллагеновых фибрилл [Yu, Wei, 2021]. Показано, что на границе зон зазора и перекрытия в коллагеновых фибриллах имеется положительно заряженная область, обеспечивающая связывание для матриксных

неколлагеновых белков, также регулирующих отложения минералов [Cölfen, 2010; Nudelman *и др.*, 2010].

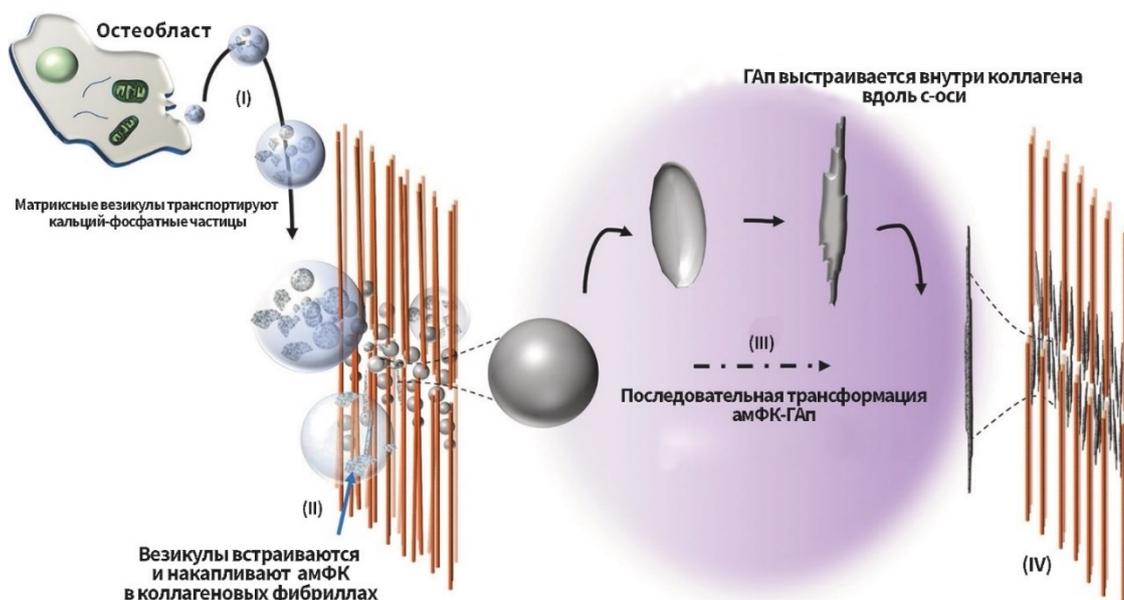


Рисунок 5 – Предположительный механизм минерализации коллагена костной ткани [адаптировано на основании Lotsari *и др.*, 2018]

3. Кристаллы фосфата кальция, зародившиеся внутри МВ, растут во всех направлениях, а затем, разрушая плазматическую мембрану, выходят из везикул, в конечном итоге образуя минерализованные узелки, которые также называют кальцифицирующими глобулами [Hasegawa *и др.*, 2017].

4. Вторичная минерализация коллагена начинается в месте контакта с минерализованными узелками и регулируется коллагеновыми фибриллами, внутри которых они формируются, а также неколлагеновыми белками [Yu, Wei, 2021]. Экстрафибриллярная минерализация коллагена происходит в виде отложения минералов на поверхности коллагеновых фибрилл в отсутствие ингибиторов нуклеации [Kim *и др.*, 2016]. Коллагеновая сеть действует как каркас для отложения минералов и вместе с неколлагеновыми белками определяет размер и распределение кристаллов апатита в кости [Wang *и др.*, 2012]. Методом ПЭМ было показано, что минерализация распространяется от точки контакта минерализованных узелков к периферии коллагеновых фибрилл, т.е. минерализация коллагена упорядоченно прогрессирует от точек контакта с минерализованными узелками, обеспечивая регулярное отложение кристаллов фосфата кальция [Hasegawa *и др.*, 2011]. Первоначально кристаллы апатита ориентируют свои с-оси параллельно волокнам коллагена, но в конечном итоге все доступное внутрифибриллярное пространство заполняется минералом [Golub, 2009].

1.4 Роль неколлагеновых белков, гликозаминогликанов и микроэлементов в организации и функционировании костной ткани

1.4.1 Белки, содержащие γ -карбоксихлутаминовую кислоту

Среди неколлагеновых белков ВКМ КТ особо важную роль играют белки, содержащие в своём составе γ -карбоксихлутаминовую кислоту (Gla) [Finkelman, Butler, 1985]. К Gla-содержащим белкам КТ относятся остеокальцин (OCN), матриксный Gla протеин (MGP) и периостин [Wen *и др.*, 2018].

Наиболее распространённым неколлагеновым белком в КТ является OCN, который представляет собой белок массой около 5,8 кДа, состоящий из одной цепи, содержащей 49–50 аминокислот [Hauschka *и др.*, 1989]. OCN специфически экспрессируется синтезирующими ОБ и содержит три остатка Gla, которые придают ему способность связывать кальций, регулируя таким образом его метаболизм и опосредуя связывание с ГАп. Хотя точный механизм действия OCN неясен, предполагается, что OCN влияет на минерализацию кости, частично благодаря его способности связываться с высоким сродством к минеральному компоненту кости и благодаря его кислотному характеру [Ducy *и др.*, 1996]. Связывая ГАп, OCN ускоряет его зародышеобразование и играет активную роль на ранних стадиях регенерации кости [Rammelt *и др.*, 2005]. В дополнение к связыванию с ГАп OCN участвует в передаче сигналов клетками и рекрутировании ОК и ОБ, которые играют активную роль в резорбции и формировании кости соответственно [Chenu *и др.*, 1994]. Процесс резорбции кости снижает сродство OCN к ГАп, тем самым увеличивая высвобождение OCN в кровоток. Циркулирующий OCN действует как гормон, регулирующий глюкозный и энергетический обмен и его концентрация в сыворотке крови может использоваться в качестве биохимического индикатора остеогенеза [Mizokami, Kawakubo-Yasukochi, Hirata, 2017].

MGP представляет собой внеклеточный белок массой 14 кДа, который синтезируется ОБ, ОК и хондроцитами. В исследования, проведённых на мышах с дефицитом MGP наблюдалась преждевременная минерализация костей, в то время как у мышей с гиперэкспрессией MGP в ОБ было выявлено снижение минерализации при интрамембранозном остеогенезе, а также гипоминерализованный дентин и цемент зубов [Kaipatur, Murshed, McKee, 2008]. Таким образом, MGP отвечает за поэтапное формирование костной ткани и ингибирование эктопической минерализации.

В свою очередь, периостин в основном секретируется ОБ и их клетками-предшественниками в трубчатых костях, а также обнаруживается в других органах, таких как сердце [Wen *и др.*, 2018]. Структурно периостин содержит N-концевой секреторный

сигнальный пептид, за которым следуют богатый цистеином домен (домен EMI), четыре внутренних гомологичных повтора (домены FAS) и С-концевой гидрофильный домен, который подвергается альтернативному сплайсингу [Hoersch, Andrade-Navarro, 2010]. В качестве молекулы адгезии периостин способствует агрегации, прикреплению, пролиферации и дифференцировке ОБ путем связывания с рецепторами клеточной поверхности. Кроме того, он участвует в сворачивании коллагена и фибрилlogenезе, что необходимо для сборки матрикса и дальнейшего поддержания прочности костей [Wen *и др.*, 2018].

1.4.2 Гликопротеины костной ткани

Гликопротеины КТ представляют собой сложные двухкомпонентные белки, в которых к пептидной части молекулы ковалентно пришиты олигосахариды в различных сочетаниях и положениях. Наиболее важным и распространенным представителем гликопротеинов в костном матриксе является остеонектин (ON), также известный как секретлируемый кислый и богатый цистеином белок (SPARC). Он присутствует в минерализованных тканях, и его экспрессия наиболее активно наблюдается в ОБ. ON связывается с коллагеном типа I, типа III и типа V, тромбоспондином и ГАп [Cleardin *и др.*, 1988; Kelm, Mann, 1991; Termine *и др.*, 1981]. Высокое сродство к ионам Ca^{2+} и Pi может свидетельствовать о том, что ON может способствовать отложению минералов; однако ON накапливается только в минерализованной матриксе, что позволяет предположить, что он не участвует в стадии индукции минерализации, но может играть важную роль в регулировании роста и пролиферации кристаллов ГАп. У мышей с дефицитом ON развивается остеопения со значительной потерей трабекулярной костной ткани [Boskey *и др.*, 2003; Delany *и др.*, 2000]. Эти результаты подтверждают, что ON участвует в регуляции ремоделирования кости и поддержании костной массы [Delany *и др.*, 2000].

Также относящиеся к гликопротеинам тромбоспондины (TSP), а именно TSP1-TSP5, присутствуют в развивающемся скелете и регенерирующих костях и экспрессируются ОБ. У мышей глобальный нокаут TSP-1, -3 и -5 может вызывать серьезные аномалии в развитии скелета [Delany, Hankenson, 2009]. При этом, у TSP1-нулевых мышей наблюдается нарушение нормального фибрилlogenеза коллагена, увеличение костной массы и объема кортикальной кости, а также стимулируется дифференцировка ОБ, что частично происходит за счет активации сигнального пути TGF- β [Amend *и др.*, 2015].

В свою очередь, содержащих тромбоспондиновые повторы R-спондины, принадлежащие к семейству матрицеллюлярных белков, представляют собой группу из четырех секретируемых гомологичных гликопротеинов (Rspo1-4), содержащих богатые лейцином повторы (Lgr4/5/6). Они широко экспрессируются на разных стадиях развития скелетной ткани и действуют как усилитель Wnt/b-catenin сигнального пути через связанные с G-белком рецепторы 4, 5 и 6. В костной ткани R-спондины идентифицированы как регуляторы эмбрионального развития костей и ремоделирования костей взрослых [Shi *и др.*, 2017a].

1.4.3 Малые интегрин-связывающие лиганды, N-связанные гликопротеины/SIBLINGs

Обнаруживаемые в зрелых, минерализованных тканях N-связанные гликопротеины или малые интегрин-связывающие лиганды (SIBLINGs), представляют собой семейство гликофосфопротеинов, которое включает дентинный матриксный белок-1 (DMP1), остеопонтин (OPN), костный сиалопротеин (BSP), матриксный внеклеточный фосфогликопротеин (MEPE) и дентиновый сиалофосфопротеин (DSPP) [Bellahcène *и др.*, 2008].

BSP представляет собой высокогликозилированный фосфопротеин, который экспрессируется на начальных этапах минерализации. В результате делеции гена BSP у мышей значительно снижается скорость остеогенеза, отложение цемента, а также уменьшаются толщина кортикального слоя и длина трубчатых костей. BSP крайне важен для регуляции дифференцировки ОБ и инициации минерализации матрикса в КТ [Marinovich *и др.*, 2016].

Подобно BSP, OPN является основным регулятором остеогенеза, минерализации и, особенно, костного метаболизма. В структуре OPN наблюдается обилие серин- и аспартат-богатых мотивов, которые являются потенциальными сайтами фосфорилирования, участвующими в ингибировании минерализации. Высокий уровень экспрессии OPN свойственен как ОБ, так и ОК и одонтобластам. При ремоделировании КТ OPN регулирует остеокластогенез и активность ОК [Singh *и др.*, 2018].

DMP1 и MEPE в основном продуцируются полностью дифференцированными ОБ и ОЦ а также экспрессируются одонтобластами и клетками пульпы. DSPP важен для минерализации зубного дентина и, следовательно, присутствует в большом количестве именно в ткани дентина [Bouleftour *и др.*, 2019]. У мышей, лишенных DMP1, обнаруживаются серьезные дефекты костей, проявляющиеся в деформировании и

недостаточной минерализации костей скелета и коррелирующих с повышенной экспрессией фактора роста фибробластов 23 (FGF23) и пониженным уровнем фосфора в сыворотке крови [Janí *и др.*, 2016]. Нокаут гена MEPE увеличивает трабекулярную плотность и костную массу у мышей и сопровождается формированием аномальной губчатой КТ. Более того, MEPE взаимодействует с RHEX и DMP1, влияя на экспрессию FGF23, тем самым регулируя метаболизм фосфатов, минерализацию и ремоделирование КТ [Zelenchuk, Hedge, Rowe, 2015]. Таким образом, DMP1 и MEPE являются ключевыми регуляторами минерализации матрикса и метаболизма фосфатов.

1.4.4 Роль протеогликанов в организации и функционировании костной ткани

Другими важными неколлагеновыми белками в составе ВКМ кости являются протеогликаны, которые характеризуются наличием остатков гликозаминогликанов (ГАГ), ковалентно связанных с белковым ядром. Из шести различных групп ГАГ (гепарин/гепарансульфат, хондроитинсульфат (ХС)/дерматансульфат, кератинсульфат (КС) и гиалуроновая кислота) ХС и КС наиболее распространены в костях [Coulson-Thomas *и др.*, 2015].

ГАГ в составе протеогликанов выполняют две основные функции в КТ:

1. регулируют структуру и организацию ВКМ;
2. регулируют взаимодействие клеток с факторами роста.

Важным семейством протеогликанов в КТ являются небольшие богатые лейцином протеогликаны (SLRPs), к которым относят аспорин, декорин, бигликан и кератокан. SLRPs взаимодействуют с рецепторами клеточной поверхности и цитокинами, регулируя как нормальное, так и патологическое поведение клеток, включая пролиферацию клеток, остеогенез, ремоделирование и минерализацию [Kirby, Young, 2018]. Также данное семейство регулирует процесс нормального фибриллогенеза коллагена, нарушение регуляции которого приводит к дефектам в организации и продукции коллагена, приводящих к фиброзу вместо полноценной регенерации КТ [Moorehead, Prudnikova, Marcolongo, 2019].

Помимо выполнения структурной роли, такие ГАГ, как гепарансульфат (ГС), являются важными регуляторами взаимодействия клеток с различными ростовыми факторами [Bishop, Schuksz, Esko, 2007]. Способность ГС связывать и защищать факторы роста от протеолитической деградации и даже усиливать взаимодействие факторов роста и соответствующих рецепторов давно признана. Было показано, что многие факторы роста, имеющие отношение к регенерации кости (такие как FGF, BMP, TGF, VEGF, PDGF),

связываются с различными видами ГС через их уникальные гепарин/ГС-связывающие домены [Hileman *и др.*, 1998].

1.4.5 Роль микроэлементов в организации и функционировании костной ткани

Кость постоянно ремоделируется путём чередования процессов образования и резорбции КТ. Баланс между этими двумя процессами жёстко регулируется механическими и гормональными факторами, а его нарушение приводит к различным патологиям [Ciosek *и др.*, 2021]. Важную роль в нормальном функционировании КТ играют различные ионы, такие как натрий (Na^+), калий (K^+), кальций (Ca^{2+}), магний (Mg^{2+}), стронций (Sr^{2+}), медь (Cu^{2+}), цинк (Zn^{2+}), железо (Fe^{3+}) и др [Gaffney-Stomberg, 2019].

Ионы, присутствующие в организме, постоянно химически реагируют друг с другом и вследствие этого могут в любой момент вступать в процесс синтеза минерального компонента КТ. Известно, что минерализованные ткани в разных участках КТ имеют различные стехеометрический состав и кристалличность ГАп за счёт включения в его состав различных ионов, причем даже в следовых количествах [Eliaz, Metoki, 2017]. При этом для некоторых ионов можно выделить места наибольшей концентрации в костной ткани. Так наиболее высокие уровни Mg^{2+} в костях были обнаружены на поверхности ГАп и в гидратационной оболочке вокруг кристалла компактной костной ткани [Castiglioni *и др.*, 2013]. Для Ba^{2+} известно, что в основном он встраивается в минерализующиеся участки, особенно в пластины роста трубчатых костей крыс (участки хряща, расположенные около эпифизов костей) [Panahifar *и др.*, 2016]. При этом неизвестно, с чем связано подобное накопление.

Роль ионов в регуляции образования КТ заключается в том, что многие из них входят в качестве кофакторов в состав различных ферментов, некоторые из которых участвуют в синтезе ВКМ и его минерализации. Например, Mg^{2+} активирует более 300 ферментов, участвующих в метаболизме углеводов, нуклеиновых кислот и белков, стимулирует активность ОБ и ферментов группы фосфатаз, которые участвуют в остеогенезе [Leidi *и др.*, 2011; Swaminathan, 2003]. Железо участвует в синтезе коллагена и превращении 25-гидроксивитамина D в его активную форму. Цинк отвечает за ДНК-связывающую способность многих факторов транскрипции благодаря уникальной способности образовывать молекулы, известные как цинковые пальцы [Ciosek, Kot, Rotter, 2023]. Он также обладает выраженным остеобластогенным действием и ингибирующим действием на остеокластогенез.

Важно отметить, что нарушения в метаболизме и строении КТ могут наблюдаться как при недостатке, так и избытке микроэлементов. В общем случае дефицит тех или иных микронутриентов приводит к ухудшению механической прочности и плотности КТ. Так относительно дефицита Mg^{2+} установлено, что его недостаточное потребление с пищей способствует развитию остеопороза [Castiglioni и др., 2013]. Кости животных с дефицитом Mg^{2+} отличаются хрупкостью и склонны к переломам, с видимыми трабекулярными микротрещинами. При этом повышенный уровень Mg^{2+} тоже оказывает негативное влияние на жесткость и прочность костей [Castiglioni и др., 2013]. Было обнаружено, что повышенное потребление Mg^{2+} у женщин в постменопаузе сопровождается более частыми переломами запястья [Nieves, 2013], оказывает вредное воздействие на функцию паращитовидной железы, что приводит к нарушению метаболизма КТ и её минерализации.

Также стоит отдельно отметить роль стронция (Sr^{2+}), которому уделяется большое внимание в терапии остеопороза. Сходство по размеру и заряду между Sr^{2+} и Ca^{2+} позволяет данному иону включаться в минеральную фазу кости [Andersen и др., 2013]. Стронций естественным образом откладывается в минеральной фазе костей при обычном питании и заменяет примерно 0,035% содержания кальция [Wan и др., 2020]. Большинство экспериментов *in vitro* подтверждают механизм двойного действия, при котором Sr^{2+} стимулирует образование кости и препятствует её резорбции [Saidak, Marie, 2012]. Точный механизм действия Sr^{2+} в костной ткани остается до конца неизученным, но предполагается, что Sr^{2+} действует на те же клеточные мишени, что и Ca^{2+} , активируя рецептор, чувствительный к кальцию (CaSR), таким образом взаимодействуя с кальциевыми сигнальными путями, связанными с регуляцией костного метаболизма [Saidak, Marie, 2012].

1.5 Использование кальций-фосфатных соединений в качестве остеопластических материалов

Несмотря на наличие у КТ собственных механизмов заживления, её регенеративный потенциал в организме человека ограничен. Так, при возникновении критически размерных дефектов (более 6-25 мм, в зависимости от гистотипа КТ у человека) ресурсов организма недостаточно для полноценной регенерации [Schemitsch, 2017]. Вследствие этого возникает необходимость создания материалов, пригодных для заполнения подобных дефектов и одновременно с этим способных стимулировать регенерацию КТ. Среди таких материалов широкое распространение получили материалы на основе различных синтетических кальций-фосфатных соединений (КФС).

КФС представляют собой соединения, содержащие катионы кальция (Ca^{2+}) вместе с ортофосфатными (PO_4^{3-}), метафосфатными (PO_3^-), пирофосфатными ($P_2O_7^{4-}$) и другими

фосфатными анионами, а иногда также включающие в свой состав ионы водорода (H^+) или гидроксид аниона (OH^-) и являются синтетическими аналогами минеральной составляющей КТ [Eliaz, Metoki, 2017]. Перечень фосфатов кальция и их физико-химические характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Кальций-фосфатные соединения и их основные характеристики [Canillas *и др.*, 2017]

Соединение	Формула	Соотношение Ca/P	Растворимость при 25 °С, $-\log K_s$
Монокальций фосфат	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,5	1,14
Монокальцийфосфат гидрат	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,5	1,14
Дикальцийфосфат дигидрат (минерал брушит)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1,0	6,59
Дикальцийфосфат (монетит)	$CaHPO_4$	1,0	6,90
Октакальцийфосфат	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	1,33	96,6
α -Трикальцийфосфат	$\alpha-Ca_3(PO_4)_2$	1,5	25,5
β -Трикальцийфосфат	$\beta-Ca_3(PO_4)_2$	1,5	28,9
Аморфные фосфаты кальция	$Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot nH_2O$, $n = 3 - 4.5$; 15%–20% H_2O	1,2-2,2	
Кальцийдефицитный гидроксиапатит	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	1,5-1,67	~85
Гидроксиапатит	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	116,8
Флюорапатит	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	1,67	120,0
Оксиапатит	$Ca_{10}(PO_4)_6O$	1,67	~69
Тетракальций фосфат	$Ca_4(PO_4)_2O$	2,0	38-44

Первая попытка имплантации синтетического (а именно трикальций фосфата (ТКФ)) КФС-материала для восстановления хирургически созданных переломов костей кролика была сделана в 1920 году американским хирургом Фредом Хоулеттом Олби [Albee, 1920]. При введении ТКФ по месту дефекта наблюдался более быстрый рост и срастание костей, по сравнению с контролем. Однако только в 1970-х годах первые синтетические КФС-импланты были введены в клиническую практику. В дальнейшем, в 90-х годах XX века, использование КФС-материалов значительно увеличилось из-за растущей обеспокоенности общества по поводу возможной передачи инфекций алло- и ксенотрансплантатами,

особенно таких как вирус иммунодефицита человека и энцефалит крупного рогатого скота [Ginebra *и др.*, 2018].

На сегодняшний день применение КФС включает в себя аугментацию потерянного объема альвеолярной кости, вызванного пародонтитом, операции синус-лифтинга и контурной пластики, остеointegrацию зубных имплантов, а также восстановление больших объемов КТ, вызванных иссечением опухолей [Ginebra *и др.*, 2018; Hou *и др.*, 2022]. КФС также используются в виде инъекционных цементов и паст (филлеров) и в качестве покрытий на имплантах из титана и титанового сплава с целью сочетания биологических свойств КФС и прочностных характеристик металла [Al-Sanabani, Madfa, Al-Sanabani, 2013].

Широкое применение в клинической практике материалы на основе КФС получили вследствие целого ряда факторов, среди которых можно выделить возможность получения разнообразных КФС-материалов с заданными физико-химическими характеристиками (формой, пористостью, прочностью и т.д.), а также выраженные остеоиндуктивные и остеоиндуктивные свойства [Lu, Yu, Chen, 2018]. Несмотря на определенные клинические успехи, на сегодняшний день продолжается поиск новых подходов к созданию и модификации материалов на основе КФС. Основное внимание исследователей сосредоточено на модификации существующих КФС-материалов для повышения их остеогенности [Pupilli *и др.*, 2022]. Помимо этого ведутся активные исследования по возможности использования КФС как средств доставки различных ростовых факторов, лекарств, плазмид и т.д., стимулирующих регенерацию КТ пациента [Bose, Tarafder, 2012].

Тем не менее, КФС также обладают и рядом недостатком, что ограничивает их использование и ставит вопрос о необходимости их дальнейшей модификации. Например, плохие механические свойства и хрупкость не позволяют использовать данные материалы в дефектах с большой механической нагрузкой, таким образом ограничивая их применение в ортопедии и стоматологии. Первоначальная идея разработки имплантатов из КФС требовала оптимизации механических свойств для обеспечения стабильности. Поэтому было приложено много усилий для получения высокотемпературного ГАп с низкой пористостью и высокой кристалличностью, чтобы повысить прочность и свести к минимуму чрезмерную реакционную способность. Однако вскоре стало очевидно, что спеченный ГАп, помимо приобретенной вследствие высокотемпературной обработки биоинертности и высокой хрупкости, не поддается биологическому разложению, поскольку ОК не способны быстро растворять его стабильную, стехиометрическую и высококристаллическую структуру и, следовательно, такие материалы не могут замещаться

полноценной КТ. Пытаясь увеличить скорость деградации, в конце 1980-х Daculsi и соавторы представили подход, основанный на использовании двухфазных КФС (бикальций-фосфат (БКФ)), представляющих собой сочетание ГАп с более растворимой керамической фазой β -ТКФ [Daculsi *и др.*, 1989].

Кроме того, в ряде работ было показано, что КФС могут проявлять провоспалительные свойства. Так, известно, что взаимодействие фрагментов материалов на основе КФС с окружающими тканями играет ключевую роль в развитии асептического воспаления при расшатывании имплантов. Образующиеся при износе импланта частицы биоматериала могут взаимодействовать с иммунными клетками (полиморфноядерные нейтрофилы, моноциты и др.), что приводит к активации клеток и высвобождению медиаторов воспаления [Hallab, Jacobs, 2009]. Последние затем стимулируют неконтролируемую резорбцию собственной КТ пациента (остеолиз), вызванную активацией ОК, факторами роста и цитокинами, продуцируемыми макрофагами, находящимися вокруг частиц материала [Laquerriere *и др.*, 2004]. На сегодняшний день, асептическое воспаление вследствие высвобождения частиц износа является основной причиной клинических неудач в артропластике тазобедренного сустава.

Таким образом, несмотря на широкое распространение кальций-фосфатных материалов в современной хирургии, они имеют ряд недостатков, ограничивающих их использование, что поднимает вопрос о необходимости их дальнейшего исследования и модификации.

1.6 Биологические свойства и молекулярно-клеточные механизмы биоинтеграции и отторжения кальций-фосфатных материалов

Как указывалось выше, широкое распространение использования КФС-материалов получило благодаря их доказано высокой биосовместимости и остеогенным свойствам. Считается, что материалы на основе КФС способны стимулировать процесс регенерации в месте дефекта путём дифференцировки МСК в клетки КТ. С другой стороны, несмотря на прогресс, достигнутый в создании КФС с широким спектром физико-химических характеристик и учитывая, что КФС могут также проявлять провоспалительные свойства, знания относительно молекулярных и клеточных механизмов биологического ответа на данные материалы носят отрывочный и несистематизированный характер. Вследствие этого далее будут рассмотрены имеющиеся на сегодня данные относительно биологических свойств материалов на основе КФС, а также молекулярно-клеточные механизмы биоинтеграции и отторжения кальций-фосфатных материалов.

1.6.1 Остеокондуктивные свойства кальций-фосфатных биоматериалов

Под остеокондуктивностью понимают способность материала обеспечивать адгезию клеток к его поверхности, а также пролиферацию и беспрепятственную миграцию клеток вглубь него [Eliaz, Metoki, 2017]. ОБ и их предшественники не находятся в непосредственном контакте с поверхностью имплантата сразу после имплантации [Barberi, Sprigano, 2021]. Первоначально, имплантаты адсорбируют на своей поверхности тонкий слой белков, включающий альбумин, иммуноглобулины, витронектин, фибриноген и фибронектин др. Данные белки способны регулировать клеточное поведение, создавая необходимое микроокружение для последующего ответа организма на имплантируемый материал [Barberi, Sprigano, 2021; Raphael *и др.*, 2016]. Также взаимодействие клеток с адсорбированными на поверхности КФС белками активирует различные сигнальные пути, опосредующие остеоиндуктивные свойства материала [Lukaszewska-Kuska *и др.*, 2018; Marconi *и др.*, 2021]. К таким сигнальным путям относят пути киназы фокальной адгезии (ФАК), протеинкиназы С и пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) [Chen *и др.*, 2016].

Среди сорбирующихся на поверхности белков центральную роль в остеокондуктивных свойствах КФС играют такие белки клеточной адгезии как фибронектин и витронектин, которые могут связываться с интегринами на плазматической мембране, обеспечивая прикрепление клеток к поверхности [Matsuura *и др.*, 2000]. Считается, что фибронектин и витронектин могут регулировать остеобластную дифференцировку посредством фосфорилирования ФАК и активации пути киназы 1/2, регулируемой внеклеточным сигналом (ERK1/2) [Marino *и др.*, 2010].

1.6.2 Остеоиндуктивные свойства кальций-фосфатных биоматериалов

Остеоиндукция – это способность материала рекрутировать и индуцировать дифференцировку клеток-предшественников в клетки костной ткани, прежде всего, МСК [Samavedi, Whittington, Goldstein, 2013; Ambard, Mueninghoff, 2006]. Остеоиндуктивный эффект материала необходимо рассматривать как сочетанный эффект изменения КФС окружающей среды имплантата, а также его взаимодействие со всеми клетками в области имплантации, что в совокупности приводит к созданию необходимого остеогенного микроокружения [Tang *и др.*, 2018].

При имплантации костного материала в организм происходит его взаимодействие с кровью и тканевой жидкостью организма, которые содержат различные неорганические ионы (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- и др.), органические вещества (глюкоза, АТФ и др.), а также различные

белки, цитокины и факторы роста. При взаимодействии КФС с данными средами происходит растворение поверхностного слоя биоматериала с увеличением локального содержания ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} в жидкости организма и последующей их перекристаллизацией с образованием нового апатитного слоя, поглощающего при формировании белки и другие факторы роста, запускающие образование новой КТ.

При изучении механизма остеоиндукции КФС-материалов предполагается, что эндогенные ВМР могут являться основными белками, опосредующими остеоиндуктивное действие КФС [Urist, Strates, 1971]. Так, например, в исследовании *in vitro* показано, что КФС-керамика обладает способностью интенсивно поглощать бычий ВМР [Tang *и др.*, 2018]. Дополнительные доказательства были получены в последующих исследованиях *in vivo*, в которых методом иммуногистохимии показано накопление ВМР в керамике через 30 дней после имплантации свиньям до начала формирования новой КТ [Yuan *и др.*, 1998b]. В дальнейшем, De Groot (1998) предположил, что растворение и переосаждение апатитного слоя на поверхности КФС приводит к сосаждению ВМРs до концентраций, достаточных, чтобы вызывать остеоиндуктивные эффекты [De Groot, 1998]. Однако несмотря на большое количество данных относительно того, что адсорбированные или сосажденные ВМРs способствуют остеоиндуктивности КФС, всё ещё остаётся противоречие между механизмами остеоиндуктивности ВМРs и КФС-материалов. Так, КФС-индуцированный эктопический остеогенез обычно происходит через интрамембранозный остеогенез, в то время как ВМР-индуцированное эктопическое костеобразование в основном происходит через эндохондральную оксификацию [Le Nihouannen *и др.*, 2005; Yuan *и др.*, 2002].

Хотя экспрессия ВМР-2 или других сигнальных молекул в МСК, стимулированных КФС была подтверждена, все ещё неизвестен механизм данного феномена, поскольку до сих пор окончательно непонятен источник образования ВМР-2: путем сорбции из тканевой жидкости или вследствие секреции клетками, индуцированными КФС [Tang *и др.*, 2018]. Для выявления данного механизма, стромальные клетки костного мозга культивировали на ГАп и БКФ керамике в отсутствие дополнительных экзогенных остеогенных факторов и сравнивали остеобластную дифференцировку с экспрессией генов молекул сигнального каскада ВМР/Smads. По результатам работ было выдвинуто предположение, что КФС-керамика может инициировать остеобластную дифференцировку МСК путём стимуляции синтеза ВМР-2 самими МСК [Tang *и др.*, 2015]. Поскольку ВМР-2 может индуцировать экспрессию других ВМР аутокринным путем, также была выдвинута гипотеза, что эта стимулированная материалом активация ВМР-2 может привести к усилению передачи сигнала данным белком [Deschaseaux, Sensébé, Heymann, 2009; Sibilla *и др.*, 2006]. Было

показано, что секреция BMP-2 стимулируется остеоиндуктивными КФС, а самый высокий уровень данного цитокина коррелировал с наиболее выраженным эктопическим неоостеогенезом [Wang *и др.*, 2014a]. Таким образом, остеоиндуктивное КФС-стимулируемое аутокринное воздействие BMP-2 на МСК может быть тем самым фактором, который инициирует дифференцировку ОБ.

Помимо этого, Klar и соавторы (2013) выявили корреляцию между экспрессией BMP-2 и формированием костей с ионами Ca^{2+} . [Klar *и др.*, 2013]. Предположительно ионы кальция (Ca^{2+}) и фосфата (PO_4^{3-}) играют большое значение в остеоиндукции КФС-материалов. Данное предположение основывается на том факте, что во время резорбции кости *in vivo* ОК, высвобождают Ca^{2+} и PO_4^{3-} из костного матрикса. Это вызывает локальное повышение концентрации ионов до уровня оказывающего существенное влияние на пролиферацию и дифференцировку ОБ, а также на последующий процесс остеогенеза [Chai *и др.*, 2012a].

Ион Ca^{2+} является одним из универсальных переносчиков биологических сигналов, который регулируют большое число клеточных процессов [Clapham, 2007]. Относительно его остеогенных свойств предполагается, что внеклеточные градиенты Ca^{2+} могут работать как хемотаксический сигнал для хоуминга преостеобластов из костного мозга к месту резорбции кости [Aguirre *и др.*, 2010; González-Vázquez, Planell, Engel, 2014]. Затем более высокая концентрация Ca^{2+} также может стимулировать созревание этих клеток-предшественников в клетки, производящие новую кость [González-Vázquez, Planell, Engel, 2014]. Таким образом, считается, что ионы Ca^{2+} , высвобождаемые при динамическом растворении КФС материалов, могут хемотаксически рекрутировать МСК и стимулировать их остеогенную дифференцировку в зависимости от концентрации.

Ранее Jung и соавторы (2010) изучали влияние высвобождаемого из ГАп Ca^{2+} на дифференцировку остеобластных клеток линии MC3T3-E1. Они предположили, что высвобождаемый Ca^{2+} может проникать в клетки через кальциевые каналы и кальций-чувствительные рецепторы (CaSR), и активировать пути CaMK2a/CAM, CREB и/или путь ERK1/2 [Jung, Park, Han, 2010]. Позже Barradas и соавторы (2012) продемонстрировали, что высокая внеклеточная концентрация Ca^{2+} усиливает пролиферацию и морфологические изменения в человеческих МСК, что сопровождается повышением экспрессии BMP-2 [Barradas *и др.*, 2012]. Однако последующие исследования показали участие в данном процессе не CaSR, а потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа, которые участвовали в сигнального пути между внеклеточным Ca^{2+} и экспрессией BMP-2. Кроме того, поскольку в этом исследовании было показано, что активность MEK1/2 важна для

действия Ca^{2+} , было выдвинуто предположению, что интернализация Ca^{2+} , вероятно, с помощью ионных каналов, последовательно активирует пути PKC, ERK1/2, ERK1/2, и, наконец, экспрессию BMP-2 посредством экспрессии Fos и образования AP-1 (активатора белка 1) [Barradas *u др.*, 2012]. Это исследование согласуется с исследованием *in vivo*, которое показало, что блокирование канала ионов Ca^{2+} приводит к подавлению экспрессии BMP-2 и ограничению формирования кости [Klar *u др.*, 2013].

Касаемо влияния фосфат ионов, в работах Beck и соавторов было обнаружено, что активация связанных с минерализацией генов, такие как *MGP* и *OPN*, в клетках MC3T3-E1 наблюдается при высокой концентрации фосфата и осуществляется посредством активации ERK1/2 и PKC-зависимых путей, но не р38зависимого пути [Beck, Zerler, Moran, 2000; Beck, Knecht, 2003]. Другим сигнальным путём, в который вовлечён Pi, является сигнальный путь аденозина. Например, Shin и соавторы доказали, что путём высвобождения фосфата КФС-материалы могут индуцировать дифференцировку МСК в ОБ посредством передачи сигналов аденозина [Shih *u др.*, 2014]. В свою очередь, исследование Khoshniat и соавторов показало, что кальций необходим для фосфат-зависимого фосфорилирования ERK1/2 и опосредованной этим регуляции экспрессии *MGP/OPN* [Khoshniat *u др.*, 2011]. Shih и соавторы доказали, что высвобождаемый Pi из КФС, может проникать в клетки через переносчик *SLC20a1* [Shih *u др.*, 2014]. Затем интернализированный Pi участвует в синтезе АТФ и способствует остеобластной дифференцировке МСК в качестве аутокринной/паракринной сигнальной молекулы.

В свою очередь, Chai и соавторы продемонстрировали, что оба иона, вводимые по отдельности или в комбинации, последовательно и дозозависимым образом увеличивали экспрессию BMP-2 в клетках, происходящих из надкостницы человека [Chai *u др.*, 2011]. В работе Barradas и соавторов (2013) и исследовании Tang с коллегами (2015) *in vitro*, в которых вместо ионов Ca^{2+} использовалась КФС-керамика, показали аналогичный результат в отношении экспрессии BMP-2 [Barradas *u др.*, 2013; Tang *u др.*, 2015].

Таким образом, оба иона (Ca^{2+} и Pi), высвобождаемые КФС, могут быть вовлечены в запуск аутокринной сигнальной петли BMP-2, даже если они могут действовать разными путями. В целом эти исследования показали, что любой ион (и Ca^{2+} и Pi) могут эффективно способствовать остеобластной дифференцировке клеток-предшественников (Рис. 6).

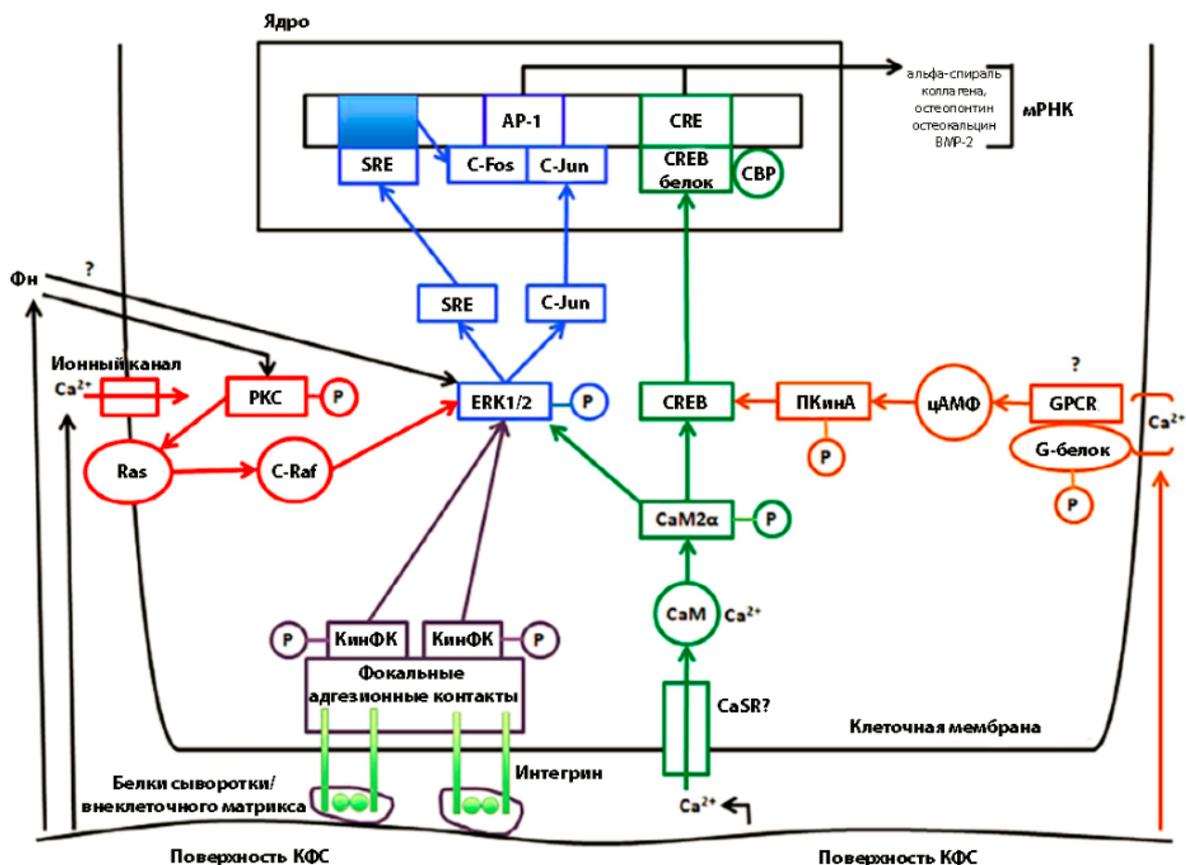


Рисунок 6 – Молекулярные механизмы дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток под действием кальций-фосфатных материалов [адаптировано на основании Samavedi, Whittington, Goldstein, 2013]

1.6.3 Взаимодействие кальций-фосфатных материалов с клетками, связанными с ангиогенезом

Эктопическое формирование кости с помощью КФС всегда требует формирования кровеносных сосудов, необходимых для снабжения кислородом и питательными веществами процессов синтеза новой КТ, что обуславливает важность процесса ангиогенеза для полноценного остеогенеза. Помимо этого, известно, что клетки, участвующие в процессе ангиогенеза, такие как эндотелиальные клетки и перициты, в условиях воспалительного репаративного процесса могут претерпевать дифференцировку в ОБ. Кроме того, исследования показывают, что эти клетки способны экспрессировать BMP-2 и BMP-7, и уровень их экспрессии значительно возрастает при воспалении [Collett, Canfield, 2005]. Фактически, BMPs являются связующим звеном между остео- и ангиогенезом, поскольку данные белки способны регулировать эндотелиально-мезенхимальный переход, что обеспечивает образование и дифференцировку МСК [Medici, Olsen, 2012]. Таким образом, роль ангиогенеза в остеоиндукции КФС может проявляться

несколькими путями. Один из них заключается в том, что секретируемые клетками цитокины, такие как BMP, рекрутируют и индуцируют остеобластную дифференцировку МСК. Второй способ заключается в обеспечении большего количества эндотелиальных клеток и перицитов для трансформации в МСК, которые в конечном итоге дифференцируются в ОБ под действием материала или цитокинов. Последний способ также обеспечивает дифференцировку других клеток-предшественников остеогенеза, таких как стромальные клетки костного мозга. Помимо этого через кровеносные сосуды происходит миграция МСК в место дефекта [Eggenhofer *и др.*, 2014].

КФС также влияют на ангиогенез при эктопическом образовании кости. Например, в работе Chen и соавторов показано, что более резорбируемый ТКФ способствует формированию большего числа кровеносных сосудов в эктопической области по сравнению с другими типами керамики, такими как ГАп или БКФ, что свидетельствует об опосредованном влиянии ионов Ca^{2+} на процессы ангиогенеза [Chen *и др.*, 2015]. Более того, считается, что Ca^{2+} -зависимая передача сигналов, играет важную роль в ангиогенезе, причем внеклеточный Ca^{2+} считается ключевым фактором, регулирующим ангиогенные свойства клеток-предшественников костного мозга.

Предполагается, что другие факторы, такие как различные углубления на поверхности материала, способны запускать быстрый ангиогенез за счет удерживаемых в них ионов Ca^{2+} . Кроме того, ангиогенез может обеспечивать инвазию МСК (миобластных/миоэндотелиальных и/или эндотелиальных, перицитарных) в эти поверхностные углубления. Таким образом, в подобном специфическом микроокружении МСК могут реагировать на локально сконцентрированные ионы или цитокины или на топографические особенности, что приводит к их ангиогенной дифференцировке [Ripamonti, 2017].

1.6.4 Взаимодействие между кальций-фосфатными материалами и клетками, ассоциированными с воспалением

Специфическая воспалительная реакция тканей на КФС-материалы является ещё одним важным фактором, лежащим в основе их остеоиндуктивности [Barradas *и др.*, 2011; Wang *и др.*, 2017]. Макрофаги и моноциты играют важнейшую роль в воспалительном ответе, а также в процессе ремоделирования и восстановления соединительной ткани. Воспалительный процесс запускается при возникновении дефекта костной ткани. При наличии КФС в области дефекта образуются постоянно доступные ионы Ca^{2+} , которые обеспечивают слияние циркулирующие моноцитов в макрофаги. Затем макрофаги при

определенной стимуляции могут секретировать цитокины, индуцирующие дифференцировку МСК в ОБ. Например, De Bruijn и соавторы показали, что макрофаги в ответ на ГАп с микрошероховатой поверхностью, продуцировали больше простагландина E2 (PGE2), по сравнению с ГАп с гладкой поверхностью, при этом PGE2 обеспечивал хемотаксис МСК и стимулировал их остеобластную дифференцировку [Tang *и др.*, 2018].

В исследовании Chen и соавторов было обнаружено, что M1/M2 переход наблюдался в ответ на экстракты β -ТКФ, и это было связано с активацией CaSR; экспрессия BMP-2 также значительно активировалась при стимуляции β -ТКФ, что указывает на то, что макрофаги могут участвовать в β -ТКФ-стимулированном остеогенезе. Более того, когда кондиционированные макрофагами экстракты β -ТСР добавляли к стромальным клеткам костного мозга (СККМ), остеогенная дифференцировка последних значительно усиливалась, что также подтверждает важную роль макрофагов в индуцированном биоматериалами остеогенезе [Chen *и др.*, 2014b]. Не только ионы, но и микрочастицы КФС, образующиеся из материала, могут влиять на поведение моноцитов или макрофагов путём секреции таких цитокинов, как ФНО- α , ИЛ-6 и ИЛ-10 [Laquerriere *и др.*, 2003; Le Nihouannen *и др.*, 2008, 2005].

Использование возможностей макрофагов/моноцитов для улучшения инженерии костной ткани было предложено Dong и Wang [Dong, Wang, 2013]. Они предположили, что некоторые остеотропные факторы (такие как ИЛ-1 β и ИЛ-4) могут продуцироваться макрофагами/моноцитами и что эти цитокины играют конструктивную роль в развитии и регенерации костей. Значительная роль макрофагов/моноцитов в остеоиндукции КФС-скаффолдов была продемонстрирована при имплантации материалов голым мышам в двух вариантах – БКФ, культивируемый с аспирином костного мозга, содержащим только МСК (1) или же как МСК, так и макрофаги/моноциты (2). Был показан более выраженный остеоиндуктивный эффект для БКФ, культивируемого с МСК и макрофагами/моноцитами [Miramond *и др.*, 2014].

1.6.5 Провоспалительные свойства кальций-фосфатных материалов

Образование и накопление кристаллических структур в тканях является отличительной чертой многих метаболических и воспалительных состояний. Известно, что различные кристаллические структуры могут опознаваться иммунной системой и активировать врожденный иммунный ответ [Franklin, Mangan, Latz, 2016]. При физиологическом взаимодействии между иммунокомпетентными клетками, костными

структурами и клетками, участвующими в их ремоделировании, такими как ОК и ОБ, в норме не происходит активации иммунных клеток и воспалительной реакции.

Как указывалось ранее, несмотря на показанную в большом количестве работ высокую эффективность и биосовместимость КФС, они также обладают рядом недостатков. Так, известно, что взаимодействие фрагментов материалов на основе КФС с окружающими тканями играет ключевую роль в развитии асептического воспаления при расшатывании твердых опорных имплантов [Velard *и др.*, 2013]. Под воздействием различных факторов на материал могут образовываться кальцийфосфатные частицы, взаимодействующие с воспалительными клетками, такими как моноциты и нейтрофилы, что приводит к образованию таких медиаторов воспаления как ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α . Так, в работе Velard и соавторов частицы ГАп приводили к увеличению продукции нейтрофилами таких цитокинов и хемокинов, как ИЛ-1 α и ИЛ-8 [Velard *и др.*, 2009]. Исходя из этих данных, оказывается, что стимуляция кальцийфосфатными частицами полиморфноядерных нейтрофилов приводит к формированию положительной воспалительной обратной связи и, таким образом, стимулирует продукцию вредных для гомеостаза КТ воспалительных медиаторов. Неконтролируемая продукция медиаторов воспаления может привести к повреждению ВКМ и деградации коллагена IV типа вблизи кровеносных сосудов в сочетании с градиентами хемокинов и привлечением множества новых клеток иммунной системы, т.е. усугублению воспалительного процесса.

Запуск воспалительного процесса может произойти либо через фагоцитоз кристаллов КФС, либо через прямое взаимодействие кристаллов с клеточными мембранами без участия фагоцитоза [Franklin, Mangan, Latz, 2016]. Хотя некоторые случаи воспаления могут быть вызваны только контактом кристаллов с клеточными мембранами, основная часть воспалительной реакции, обусловленной кристаллами, происходит вследствие их поглощения иммунными клетками [Ng *и др.*, 2008]. Фагоцитоз крупных частиц может повредить лизосомальные мембраны, вызывая лизосомальные повреждения. Это приводит к выходу лизосомальных протеаз (например, катепсинов) в цитозоль клетки, где они переваривают жизненно важные белки и воздействуют на другие органеллы, такие как МХ. Катепсины, высвобождаемые после лизосомальных повреждений, могут повреждать МХ и вызывать гибель клеток, связанную с пермеабиллизацией внешней мембраны МХ. Это приводит к тому, что проапоптотические молекулы, такие как цитохром с, высвобождаются в цитозоль и активируют каспазы, приводящие к клеточной гибели [Lima *и др.*, 2013; Wang, Gómez-Sintes, Boya, 2018].

В зависимости от их типа и морфологии кристаллы могут способствовать высвобождению множества провоспалительных медиаторов, таких как цитокины и липидные медиаторы воспаления [Kuroda *и др.*, 2011; Satpathy *и др.*, 2015]. Несмотря на большое количество провоспалительных молекул, высвобождаемых при лизосомальных повреждениях, экспрессия провоспалительных цитокинов семейства интерлейкинов-1 (ИЛ-1 β , ИЛ-18 и ИЛ-1 α) является центральным механизмом, связывающим все патологии, индуцированные кристаллами.

Одним из наиболее изученных механизмов воспаления, вызванного кристаллами, является их способность активировать цитозольный рецепторный комплекс, называемый воспалительной инфламмасомой, содержащей домены NACHT, LRR и PYD, содержащей белок 3 (NLRP3) [Martinon, Mayor, Tschopp, 2009]. Точный механизм индуцированной кристаллами активации NLRP3 обсуждается (Рис. 7). Однако общепринятая модель включает лизосомальные повреждения, опосредованные кристаллами, хотя остается неясным, как именно этот процесс инициирует активацию NLRP3 [Hornung, Latz, 2010; Hornung *и др.*, 2008]. Высвобождение лизосомального кальция, протеолиз катепсином В и митохондриальные активные формы кислорода (АФК) участвуют в этом процессе, но индивидуальный вклад каждого из этих механизмов остается неизвестным [Dostert *и др.*, 2008; Hornung *и др.*, 2008; Murakami *и др.*, 2012].

NLRP3, член семейства NOD-подобных рецепторов (NLR), является наиболее хорошо охарактеризованным членом семейства NLR, способным образовывать инфламмасомы. После активации NLRP3 апоптоз-ассоциированный Speck-подобный белок (ASC), содержащий домен рекрутирования каспазы (CARD), рекрутируется на NLRP3, что индуцирует образование филаментов ASC [Cai *и др.*, 2014; Lu *и др.*, 2014]. ASC обеспечивает молекулярную платформу для рекрутирования прокаспазы-1 посредством взаимодействий CARD/CARD. Рекрутирование прокаспазы-1 на филаменты ASC приводит к аутопротеолитической активации каспазы-1. Активная каспаза-1, в свою очередь, расщепляет предшественники цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-18 и опосредует их высвобождение из клеток.

Другой механизм, предположительно участвующий в индуцированной кристаллами активации NLRP3 – это способность кристаллов индуцировать образование АФК, которые генерируются при воздействии кристаллов на макрофаги [Cassel *и др.*, 2008; Eisenbarth *и др.*, 2008]. Источник АФК остается спорным. Хотя нокдаун NADPH-оксидазы, необходимого фермента для производства АФК, и использование антиоксидантов ингибируют активацию NLRP3 кристаллами, генетический дефицит NADPH не

предотвращает NLRP3-зависимую активацию каспазы-1/ИЛ-1 β [Dostert *и др.*, 2008; Meissner *и др.*, 2010; Rada *и др.*, 2014].

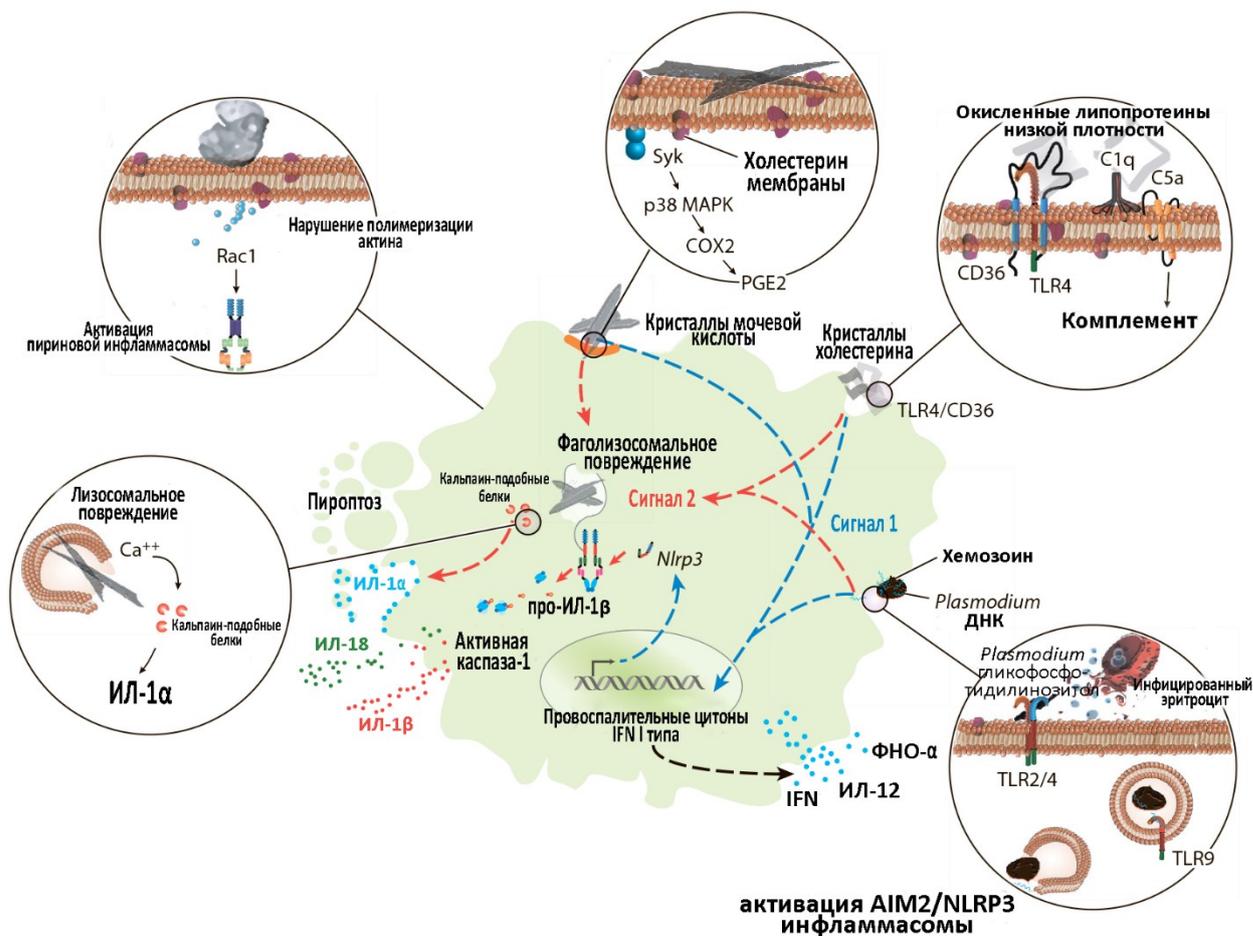


Рисунок 7 – NLRP3-независимое и зависимое индуцированное кристаллами воспаление [адаптировано на основании Franklin, Mangan, Latz, 2016]

Активация NLRP3 кристаллами или другими триггерами в макрофагах обычно требует стимуляции клеток провоспалительным стимулом, таким как агонисты Toll-подобных рецепторов, цитокины или другие активаторы NF- κ B [Bauernfeind *и др.*, 2009; Franchi, Eigenbrod, Núñez, 2009]. Была предложена модель, согласно которой инфламмасоме требуются по крайней мере два сигнала: сигнал 1, который является начальным сигналом для клеток, тогда как сигнал 2 приводит к сборке инфламмасы. При этом в ряде работ было продемонстрировано, что кристаллические структуры могут обеспечивать как сигнал 1, так и сигнал 2. Так, кристаллы могут распознаваться системой комплемента, что приводит к продукции провоспалительного медиатора C5a. C5a является первичным сигналом для последующей активации инфламмасом кристаллами [An *и др.*, 2014; Nymo *и др.*, 2014; Samstad *и др.*, 2014]. В других случаях, например при атеросклерозе, окисленные липопротеины низкой плотности распознаются на клеточной поверхности

TLR4/6 и рецептором-мусорщиком CD36, что приводит к праймированию макрофагов [Stewart *и др.*, 2010]. Следовательно, несколько врожденных иммунных сигнальных путей взаимодействуют при распознавании определенных кристаллов и провоцируют воспалительную реакцию.

Ещё один механизм токсичности кристаллов связан с их взаимодействием с клеточными мембранами. Контакт кристаллов с мембранами в отсутствие фагоцитоза может быть достаточным для активации NLRP3 способом, который зависит от притока ионов [Hari *и др.*, 2014].

1.6.6 Механизмы резорбции материалов на основе кальций-фосфатных соединений

Ещё одним важным свойством КФС-материалов является их резорбируемость, которая заключается в постепенном растворении импланта в организме со скоростью сопоставимой со скоростью образования неокостной ткани. Имплантированные КФС могут резорбироваться с помощью различных механизмов. Биодegradация биоматериалов на основе КФС может происходить за счет их растворения тканевой жидкостью. Однако клеточно-опосредованная резорбция является центральным путём биодegradации материалов на основе КФС [Lu *и др.*, 2002].

Sheikh и соавторы описали процесс дegradации имплантированных материалов как три реакции (физическая, химическая, биологическая) и две стадии:

1. раннее растворение;
2. клеточно-опосредованное поглощение [Sheikh *и др.*, 2015c].

Физическая реакция – это процесс дegradации материала путем растворения, при котором поверхность биоматериала превращается в остеоподобный апатит ионного обмена, повторного осаждения и ряда реакций, прежде чем материал окончательно распадается на мельчайшие частицы. Для биологической реакции дegradация и абсорбция материала предполагают взаимное участие клеток, включающих ОК, ОБ, фибробласты, макрофаги и многоядерные гигантские клетки инородного тела (ГКИТ) [Nakamura *и др.*, 2013; Ogle *и др.*, 2016; Sheikh *и др.*, 2015a]. Биорезорбция КФС-цементов *in vivo* может осуществляться через фагоцитарный механизм, характерный для моноцитов и макрофагов, или кислотный механизм через ОК посредством снижения рН в микроокружении [Heumann, Pradal, Venahmed, 1999]. Клетки, которые принимают участие в клеточно-опосредованной резорбции КФС, могут быть ОК, многоядерными ГКИТ, моноцитами и макрофагами, происходящими непосредственно из костного мозга. При этом размер частиц

имплантированных материалов КФС влияет на скорость и эффективность клеточно-опосредованной резорбции (Рис. 8) [Hannink, Arts, 2011].

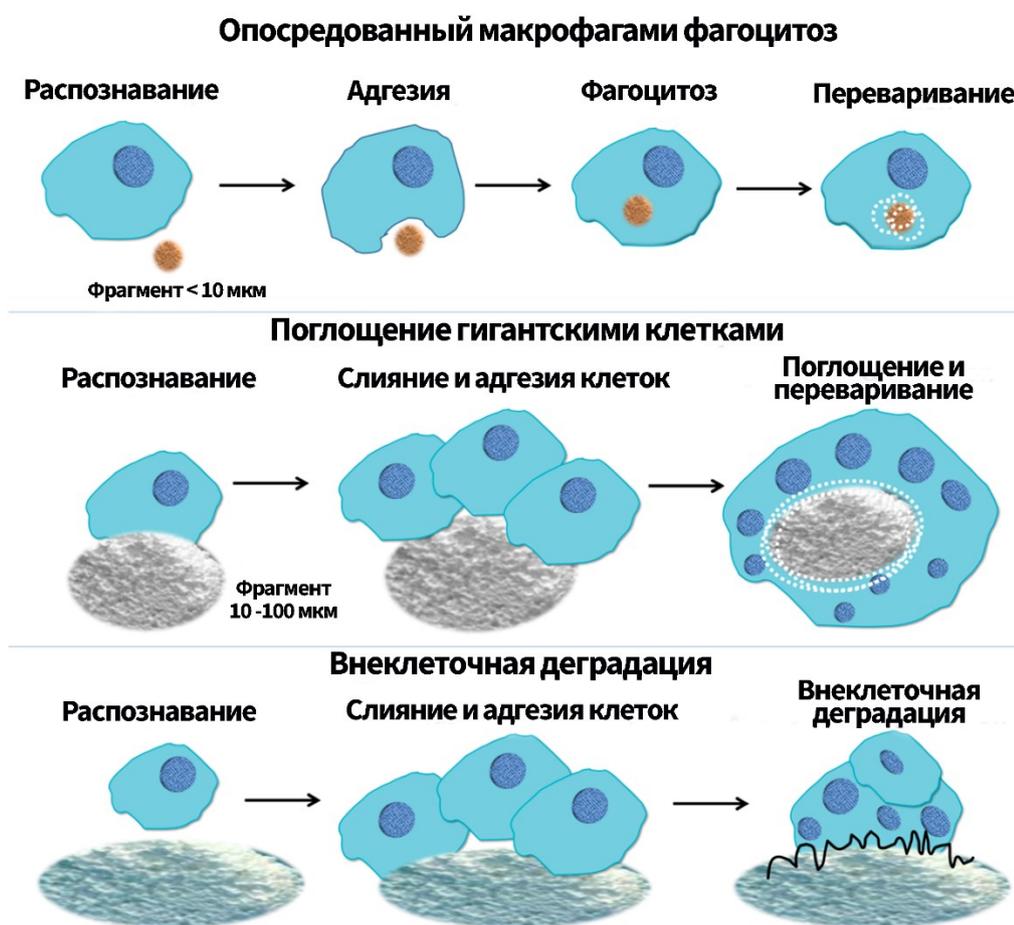


Рисунок 8 – Механизмы резорбции кальций-фосфатных биоматериалов [адаптировано на основании Sheikh *и др.*, 2015a]

Макрофаги реагируют на мелкие фрагменты и частицы (<10 мкм в диаметре) путем их интернализации посредством фагоцитоза и внутриклеточного переваривания [Lu *и др.*, 2002]. Если размер частиц больше 10 мкм и меньше 100 мкм, макрофаги сливаются вместе, образуя гигантские клетки, которые, в свою очередь, поглощают частицы и переваривают их [Sheikh *и др.*, 2015b]. Однако если частицы больше 100 мкм, их резорбция осуществляется посредством внеклеточной деградации за счет высвобождения ферментов и/или механизмов снижения pH в лизосомах макрофагов и ГКИТ [Sheikh *и др.*, 2015b; Xia, Triffitt, 2006].

Другие типы клеток, присутствующие в месте имплантации, также могут участвовать в резорбции КФС-материалов. Различные мезенхимальные клетки присутствуют в ложе имплантации материала (например, эндотелиальные клетки,

остеобласты, фибробласты и стромальные клетки костного мозга) [Heumann, Pradal, Benahmed, 1999]. Данные клетки могут индуцировать растворение КФС-цемента как посредством контакта «кристалл–клетка» и дальнейшего внеклеточного растворения, так и путем эндоцитоза с последующим внутриклеточным растворением [Heumann, Pradal, Benahmed, 1999]. Помимо этого, данные клетки играют центральную роль в фиброзной инкапсуляции имплантированных материалов, что негативно влияет на резорбцию КФС и остеоинтеграцию материала [Heumann, Pradal, Benahmed, 1999; Leeuwenburgh *и др.*, 2010].

1.7 Влияние физико-химических свойств кальций-фосфатных материалов на их биологические свойства

Как указывалось выше, из всех материалов, применяемых в клинической практике для восполнения утраченной КТ, КФС-керамика имеет наибольшее распространение вследствие схожести её химического состава с минеральным компонентом костной ткани, а также благодаря её биосовместимости, остеокондуктивности и остеоиндуктивности, показанной в многочисленных исследованиях [Tang *и др.*, 2018]. Множество исследований в настоящее время связывают остеоиндуктивные свойства КФС-материалов с их многочисленными физико-химическими характеристиками, которые могут быть оптимизированы в процессе её создания [Denry, Kuhn, 2016; Yuan *и др.*, 1998b, 1998a].

1.7.1 Влияние фазового состава и растворимости на биологические свойства кальций-фосфатных материалов

В ряде исследований зависимости остеоиндуктивных свойств КФС материалов от их физико-химических характеристик было показано, что одними из наиболее важных факторов, определяющим формирование кости, является фазовый состав КФС [Samavedi, Whittington, Goldstein, 2013; Barradas *и др.*, 2011].

Наибольшее количество исследований остеоиндуктивной активности среди КФС было проведено для ГАп, β -ТКФ и их комбинаций (ГАп/ β -ТКФ) [Barradas *и др.*, 2011]. ГАп является наиболее стабильной и наименее растворимой фазой ($K_{sp} \approx 6,62 \cdot 10^{-126}$), в то время как растворимость β -ТКФ значительно выше и составляет $K_{sp} 2,07 \cdot 10^{-33}$ при 25 °С. Однако из-за более высокой скорости растворения β -ТКФ по сравнению с ГАп, материалы на его основе не обладают необходимыми прочностными характеристиками [Yuan *и др.*, 2001]. Поэтому бифазная керамика (БКФ), состоящая из плохо растворимого ГАп и хорошо растворимого β -ТКФ в различных пропорциях, рассматривалась как способ достижения оптимальной прочности и поверхностной растворимости, необходимых для

остеоиндуктивного действия. На основании имеющихся в литературе данных остеоиндуктивность этих КФС может быть выстроена в следующем порядке:

$$\text{БКФ} > \beta\text{-ТКФ} > \text{ГАп} \gg \alpha\text{-ТКФ} \text{ [Samavedi, Whittington, Goldstein, 2013]}$$

Поскольку материалы с разным фазовым составом имеют разную растворимость, влияние фазового состава на биологические свойства частично объясняется различной растворимостью КФС-керамики. Ионная среда, формируемая материалом, может инициировать индукцию костеобразования, влияя на адсорбцию белка. Например, было показано, что растворимость КФС-керамики ($\beta\text{-ТКФ} > \text{БКФ} > \text{ГАп}$) также влияет на адсорбцию белка, путём изменения равновесной концентрации ионов вблизи поверхности материала [Zhu *и др.*, 2010]. Также была обнаружена более высокая адсорбция фибриногена, инсулина и коллагена I типа (COL-I) на БКФ, чем на поверхности ГАп [Zhu *и др.*, 2010]. По-видимому, высвобождение Ca^{2+} и PO_4^{3-} из более растворимой фазы $\beta\text{-ТКФ}$ в БКФ вызывало локальное увеличение концентрации ионов, что приводило к большему переосаждению КФС и более выраженной адсорбции белков на них, что, в свою очередь, усиливало локальный материал-ассоциированный остеогенез.

Полученные данные указывают, что более высокая растворимость КФС-керамики может приводить к более высокой остеоиндуктивности, однако так происходит не всегда. Например, чистый $\beta\text{-ТКФ}$ обладает более высокой растворимостью, чем БКФ, но его остеоиндуктивность не превосходит БКФ-керамику [Samavedi, Whittington, Goldstein, 2013; Hong *и др.*, 2010]. Кроме того, для некерамических материалов, таких как КФС-цементы, также не наблюдалось выраженных остеоиндуктивных свойств [Chen *и др.*, 2017; Habibovic *и др.*, 2008]. Несмотря на большую растворимость цементов по сравнению с КФС-керамикой их менее выраженная остеоиндуктивность могла быть частично связана с отсутствием пористой структуры и нестабильной границей раздела [Tang *и др.*, 2018].

Другим представляющим интерес с точки зрения остеогенных свойств КФС является октакальций фосфат ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Его отличительной особенностью является то, что он является предшественником биологического ГАп в костях и зубах человека. Кристалл ОКФ имеет слой воды между двумя слоями апатита. В физиологических условиях слой воды удаляется из ОКФ, и два слоя апатита объединяются, образуя кристаллы ГАп [Kim, Kim, Song, 2023]. В многочисленных исследованиях на животных были показаны превосходные остеоиндуктивные свойства ОКФ [Kim, Kim, Song, 2021; Suzuki, 2010]. При сравнении ОКФ с ГАп и ТКФ было показано, что ОКФ стимулирует процесс ремоделирования костей [Hirayama *и др.*, 2016; Shiwaku *и др.*, 2019; Suzuki *и др.*, 2006; Takami *и др.*, 2009]. Так, в работе Sato и соавторов для того, чтобы сравнить способность

КФС в степени индукции остеогенеза, гранулы ОКФ, β -ТКФ и ГАп были имплантированы в дефекты свода черепа у мышей [Sato *и др.*, 2019]. Каждый образец собирали и анализировали через десять недель после имплантации. Гистологическое окрашивание гематоксилином и эозином показало новообразованную непрерывную КТ высокой плотности в группе с имплантированным ОКФ. При этом гистоморфометрический анализ показал, что объем новообразованной кости уменьшался в ряду ОКФ \geq β -ТКФ>ГАп. Окрашивание пикросириусом красным на новообразованный коллаген показало, что площадь ориентированного коллагенового матрикса, наблюдалась больше в группе с имплантированным ОКФ, чем в группах с ГАп или β -ТКФ. Эти результаты позволяют предположить, что остеокондуктивность ОКФ может быть выше, чем у двух других материалов КФС с точки зрения ориентации коллагеновых волокон.

Таким образом, на основании сравнения КФС с различным фазовым составом можно сделать общий вывод, что при схожей пористой структуре, ОКФ и БКФ с более высокой растворимостью обладают гораздо большей остеоиндуктивностью, чем керамика на основе ГАп с низкой растворимостью.

1.7.2 Влияние пористости кальций-фосфатных материалов на их биологические свойства

Помимо влияния фазового состава и $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ ионной среды, пористость структуры также играют важную роль в остеоиндуктивности КФС-материалов. Все описанные материалы, для которых показаны остеоиндуктивные свойства имеют взаимосвязанную пористую структуру. В ряде работ показано, что пористые КФС-материалы могут способствовать формированию кости, в то время как плотная керамика КФС не может [Tang *и др.*, 2018]. Взаимосвязанные поры обеспечивают массоперенос, клеточную адгезию и вращение КТ [Hong *и др.*, 2010; Wang *и др.*, 2012]. Основная функция пор внутри материала состоит в обеспечении транспорта тканевой жидкости, кислорода и питательных вещества, а также обеспечения миграции клеток вглубь материала и развития кровеносных сосудов [Chen *и др.*, 2015; Hong *и др.*, 2010; Wang *и др.*, 2012]. Помимо этого, кровеносные сосуды также выполняют дополнительную функцию доставки клеток, предшественников ОБ [Chen *и др.*, 2015; Eggenhofer *и др.*, 2014].

Параметры пористой структуры каркасов включают как размер пор, так и форму пор и их связанность [Hong *и др.*, 2010; Wang *и др.*, 2012]. Считается, что повышенная пористость способствует увеличению остеогенеза, однако избыточная пористость ухудшает его прочностные характеристики, что часто вызывает преждевременное

разрушение имплантированного скаффолда [Wang *и др.*, 2012]. Таким образом, в зависимости от места имплантации биоактивные керамические скаффолды имеют пористость от 40% до 80%. Кроме того, количество открытых пор также напрямую связано с формированием кости. Взаимосвязанные поры и проходные поры выглядят как внутренние туннели, обеспечивающие массоперенос, адгезию клеток и вращение костной ткани [Hong *и др.*, 2010; Wang *и др.*, 2012]. Habibovic и соавторы (2008) наблюдали, что после имплантации содержащего каналы дикальцийфосфатного объёмного цемента из мышечную ткань козам на срок 12 недель, неокостная ткань в основном формировалась внутри периферических каналов центростремительно от входных отверстий вглубь материала [Habibovic *и др.*, 2008]. Для заданной пористости от 40% до 80% оптимальный диаметр пор обычно находится в диапазоне 200–500 мкм, а размер канала, сообщающегося с порами, находится в диапазоне 100–200 мкм [Hong *и др.*, 2010; Wang *и др.*, 2012].

Микропоры (диаметр пор составляет меньше 10 мкм) играют наиболее выраженное действие в стимулировании остеогенеза. Микропоры на стенках макропор не только способствуют проникновению тканевой жидкости, но и создают на стенках шероховатый микрорельеф, благоприятный для прикрепления клеток и их последующей остеогенной дифференцировки [Samavedi, Whittington, Goldstein, 2013; Barradas *и др.*, 2011; Hong *и др.*, 2010; Yuan *и др.*, 1998a; Wang *и др.*, 2012]. Внутренние поры также ограничивают поток тканевой жидкости, поддерживая таким образом концентрацию растворенных ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} в порах и снижая касательное напряжение, действующее на клетки и белки, прикрепленные к поверхности пор. Дополнительно выявлено, что частицы ГАп и БКФ с высокой пористостью и размером пор >20 нм адсорбируют больше фибриногена и инсулина, чем частицы с низкой пористостью [Zhu *и др.*, 2010]. Дополнительно показано, что распределение микропор на стенках макропор может играть положительную роль в адсорбции белков с низкой молекулярной массой (например, TGF- β 1) [Zhu *и др.*, 2009].

1.7.3 Влияние топографии и поверхностного заряда кальций-фосфатных биоматериалов на их биологические свойства

Другим важным свойством, влияющим на остеоиндуктивные свойства материала являются свойства поверхности КФС, включающие заряд поверхности и её топографию [Samavedi, Whittington, Goldstein, 2013].

Топография поверхности КФС существенно влияет на адгезию и дифференцировку клеток [Chaubey *и др.*, 2008; Rosa, Beloti, Noort van, 2003; Yim, Pang, Leong, 2007]. Так, в

исследовании Dalby и соавторов были синтезированы КФС с различными видами топографии поверхности и обнаружено, что нанотопографические поверхности вызывает значительные изменения в ответе МСК, усиливая их остеогенную дифференцировку [Dalby *и др.*, 2007]. Также на остеоиндуктивные свойства КФС оказывает влияние изменение топографии поверхности вследствие взаимодействия материала с клетками КТ. После прикрепления ОК КФС-керамика резорбируется путем кислотного гидролиза. Резорбция ОК приводит к образованию углублений поверхности в виде лакун, борозд и/или ямок, когда остеокласты перемещаются по поверхности КФС, что, в свою очередь, работает как микротопографические сигналы, влияющие на дифференцировку МСК [Ripamonti, 2017]. Было доказано, что для макропористых конструкций на основе КФС, обладающих только микротопографической геометрией поверхности, резорбция остеокластами, и изменение таким образом микротопографии поверхности, необходима для обеспечения остеоиндуктивности [Ripamonti *и др.*, 2010].

Кроме того, остеокластогенез и праймирование макропористых поверхностей ОК также могут приводить к нанотопографии, которая, как было доказано, способна контролировать дифференцировку стволовых клеток [Dalby *и др.*, 2007; McNamara *и др.*, 2010]. Известно, что постоянное присутствие Ca^{2+} , высвобождаемого КФС, а также присутствие частично растворенного КФС может способствовать трансформации макрофагов в ОК, то есть индуцировать остеокластогенез [Olszak *и др.*, 2000]. Кроме того, ионы Ca^{2+} и PO_4^{3-} , высвобождаемые резорбционной активностью ОК, также способствуют остеогенной дифференцировке и последующему формированию кости, поскольку Ca^{2+} и PO_4^{3-} ионы, скапливающиеся в углублениях поверхности, будут достигать более высокой концентрации [Chai *и др.*, 2012b].

Дзета-потенциал частиц КФС определяет степень сорбции белка на их поверхности, которая опосредуют остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства материала. Например, введение небольших количеств наноразмерных КФС в гидрофобные полимерные каркасы является эффективным средством облегчения адсорбции белка [Lee *и др.*, 2008]. Адсорбция белка на КФС может быть опосредована электростатическими взаимодействиями как с катионными сайтами кальция, так и с анионными сайтами фосфата, однако она также зависит от структуры и химического состава белков. В исследовании, которое изучало адсорбцию белка на ГАп, Kandori и соавторы предположили, что адсорбция отрицательно заряженного бычьего сывороточного альбумина при нейтральном рН на поверхностях ГАп с большей кристалличностью в первую очередь опосредована положительно заряженными участками с экспонированным Ca^{2+} , несмотря на то, что общий

заряд поверхности ГАп отрицателен [Kandori, Murata, Ishikawa, 2007]. Таким образом, наличие катионных групп способствует адсорбции белков на плохорастворимых КФС, таких как ГАп.

1.7.4 Влияние размера частиц на биологические свойства кальций-фосфатных биоматериалов

Хорошо известно, что оптимальным подходом к изготовлению искусственных костных графтов является биомиметика. В норме костный апатит состоит из наноразмерных кристаллов ГАп. Однако обычная КФС-керамика, несмотря на то, что частично имитирует костный состав и пористую структуру, имеет крупный размер частиц КФС, что ухудшает её биологические свойства [Tang *и др.*, 2018]. С точки зрения биомиметики наноразмерность кристаллов может улучшить биологические свойства КФС-керамики. Многие исследования подтвердили эту гипотезу в условиях *in vitro*. Остеогенные клетки склонны взаимодействовать с наноразмерной поверхностью биоматериалов, что способствует их адгезии, пролиферации и дифференцировке [Wang *и др.*, 2014b]. Так в работе Li и соавторов исследовалась пористая БКФ нанокерамика, полученная методом соосаждения с последующим микроволновым спеканием [Li *и др.*, 2009]. Керамическая поверхность с элементами <100 нм способствовала большей адсорбции белка по сравнению с элементами >100 нм. Кроме того, данный материал проявлял селективную адсорбцию различных ростовых факторов. Нанокерамика, благодаря высокой удельной площади поверхности, наличию поверхностных дефектов и взаимосвязанных макро- и микропор, эффективно стимулировала клеточную активность, что приводило к повышенной остеокондуктивности и остеоиндуктивности в сравнении с обычной керамикой.

Однако, несмотря на исследования, демонстрирующие высокую биосовместимость наноразмерных КФС, многие эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что её наночастицы обладают значительной цитотоксичностью, которая может быть связана с тем, что высвобождаемые ионы Ca^{2+} из интернализированных наноКФС внутри клеток инициируют апоптоз [Liu *и др.*, 2014]. Интернализированные КФС-наночастицы на самом деле приводят к разрыву лизосом, вызванному быстрым растворением КФС в кислых условиях. Таким образом, влияние размера частиц на биологическую совместимость КФС является достаточно противоречивым и требует дальнейших исследований.

Таким образом, остеогенные свойства КФС-материалов могут регулироваться путём изменения характеристик материала, включая фазовый состав, ионное окружение, макро- и микропористую структуру, топографические особенности, размер частиц и др. Эти

свойства материала могут прямо или косвенно влиять на остеоиндуктивность. Основываясь на имеющихся результатах, остеогенные свойства КФС-материалов может быть улучшены за счёт оптимизации их физико-химических свойств.

1.8 Современные подходы повышения биосовместимости и остеогенных свойств кальций-фосфатных биоматериалов

Современные подходы, направленные на улучшение биологических характеристик КФС-материалов, включают получение биомиметических КФС, их различные модификации (замещение ионов Ca^{2+} , модификация белками и т.д.), а также создание композитных материалов на основе природных и синтетических полимеров с добавлением КФС.

Высокоорганизованные кристаллы ГАп на наноуровне и образованные ими сложные пучки выровненных кристаллитов на микроуровне характерны для нативной костной ткани и оказывают влияние на механические и биологические свойства костей и зубов [Chen *и др.*, 2005; LeGeros, 2008]. Таким образом, изготовление КФС-материалов, имитирующих структуру костной и зубной тканей, является одной из наиболее перспективных стратегией улучшения их характеристик. Многие исследования показали, что костеподобный апатит, образующийся на поверхности КФС-материалов, играет важную роль в индукции образования новой КТ [Nuss, Rechenberg von, 2008; Park *и др.*, 2012]. Показано, что материалы и матриксы с нано-/микроструктурированной поверхностью обладают более выраженными биологическими свойствами, благодаря сходству с костями и зубами человека, и способствуют остеointegrации и последующей регенерации костной ткани [Liu *и др.*, 2022; Xia *и др.*, 2013].

Другим широко используемым способом улучшения биологических и физико-химических свойств ГАп является ионное замещение Ca^{2+} на другие физиологически активные ионы, такие как Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} и др. Если ионы адсорбируются или смешиваются внутри биоматериалов, не входя в кристаллическую решетку, может происходить слишком быстрое высвобождение ионов, что может оказывать токсическое действие на окружающие ткани [Laskus, Kolmas, 2017]. По мнению Li и соавторов, ионные замещения в кристаллической решетке ГАп обеспечивают значительно более низкую скорость высвобождения, что обеспечивает долгосрочную эффективность ионных биологических функций в процессе костного ремоделирования [Li *и др.*, 2018].

Среди широко исследуемых ионов для замещения наибольшее внимание привлекает Sr^{2+} вследствие его схожести с ионом Ca^{2+} и способности стимулировать остеобластогенез

с одновременным подавлением остеокластогенеза. Благодаря своему механизму действия ранелат стронция (Sr RAN) является распространённым препаратом для терапии остеопороза [Pilmane *и др.*, 2017]. Относительно исследований КФС-материалов, допированных Sr^{2+} , исследования *in vitro* Stipniесе и соавторов (2021) продемонстрировали, что образцы с самым высоким уровнем Sr-замещения (10 мас. %) проявляли самую высокую экспрессию ЦФ и повышенную экспрессию коллагена I типа (COLL I) [Stipniесе *и др.*, 2021]. Результаты показали ключевую роль ионов Sr^{2+} в созревании ОБ в ОЦ в процессе регенерации кости. Это также было подтверждено Geng и соавторами (2018), которые получили Sr-замещенный ГАп из яичной скорлупы, и показали, что его дополнительное обогащение ионами Sr^{2+} , приводило к усилению экспрессии связанных с остеогенезом генов [Geng *и др.*, 2018].

Чтобы ещё больше имитировать естественную КТ и улучшить биологические характеристики Sr-замещенного ГАп, Luo и соавторы. (2018) и Ran с коллегами (2017) изготовили композитные матрицы на основе замещенного ГАп и полимеров, имитирующих ВКМ природной КТ [Luo *и др.*, 2018; Ran *и др.*, 2017]. Исследования *in vivo*, проведённые Luo на трехмерных напечатанных биомиметических каркасах на основе Sr-замещенного ГАп и коллагена показали большой объем новообразованной КТ и улучшенные регенеративные свойства каркаса по сравнению с ГАп без замещения.

Высокопористые наноструктурированные КФС материалы также широко исследуются в качестве носителей для доставки различных лекарственных препаратов благодаря их структуре, большой площади поверхности и стабильности в биологических жидкостях [Нои *и др.*, 2022]. Как известно, КФС растворяются при слабокислом pH, что делает возможным контролируемую доставку лекарств в клетки [Li *и др.*, 2010]. Наночастицы КФС могут быть использованы для доставки антибиотиков, противовоспалительных препаратов и ростовых факторов для регенерации КТ [Levingstone, Herbaj, Dunne, 2019]. Возможность доставки антибиотиков при помощи КФС используется для лечения костных дефектов, которые инфицированы или вызваны инфекцией. При данном подходе высокие концентрации антибиотиков обнаруживаются только в интересующих анатомических участках, что сводит к минимуму их побочные эффекты [Pountos *и др.*, 2011].

Для усиления остеогенных и ангиогенных свойств КФС также возможно их сочетание с различными ростовыми факторами, такими как BMP, TGF- β , фактор роста тромбоцитов (PDGF) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [Dimitriou, Tsiroidis, Giannoudis, 2005].

Поскольку коллаген I типа и биологический апатит являются основными составляющими нормальной костной ткани, одним из распространённых подходов применяемых на сегодняшний день для создания костных заменителей является создание композитных материалов и покрытий из полимеров (как природных, так и синтетических) и КФС, максимально имитирующих структуру и состав КТ [Hoshi *и др.*, 2022]. Основной список используемых полимеров в составе композитных материалов представлен на рисунке 9.

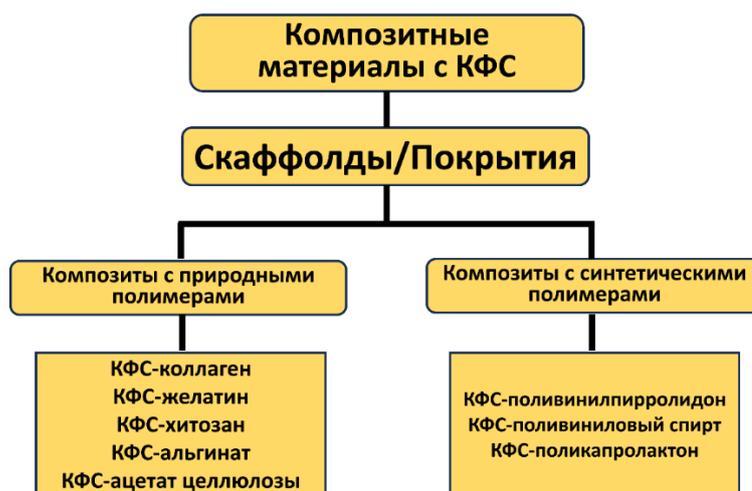


Рисунок 9 – Наиболее распространённые на сегодняшний день комбинации кальций-фосфатных биоматериалов с синтетическими и природными полимерами [адаптировано на основании Furko, Balázs, Balázs, 2023]

Существует огромное количество работ по созданию и исследованию композитных материалов на основе как синтетических, так и природных полимеров, объём которых не представляется возможным оценить в данном разделе [Battafarano *и др.*, 2021].

Поскольку создание таких материалов преследует своей целью имитацию структуры и состава КТ наиболее целесообразным представляется рассмотрение композитных материалов типа коллаген/КФС. Коллаген в комбинации с ТКФ и ГАп широко исследовался в условиях *in vitro* и *in vivo*, и в большинстве работ было показано формирование как грубоволокнистой, так и пластинчатой КТ [Schaller *и др.*, 2020]. Добавление коллагена и ГАп/ТКФ к деминерализованному костному матриксу увеличивало образование кости в дефектах критического размера свода черепа кролика [Salamanca *и др.*, 2020]. Было показано, что инъекционный цемент из коллагена/ α ТКФ способствует адгезии и пролиферации клеток *in vitro* [Perez, Ginebra, 2013]. Композиты бычьего коллагена типа I и ГАп поддерживали прикрепление и пролиферацию стволовых клеток МСК мышцы и пародонтальной связки человека [Ning, Malmström, Ren, 2015]. Zhong и соавторы

исследовали потенциальные остео- и иммуномодулирующие эффекты катион-замещенных ГАп [Zhong *и др.*, 2022]. Ионы Zn^{2+} и Sr^{2+} вводили в ГАп и покрывали им коллагеновую матрицу с использованием биомиметического метода. Разработанный таким способом композит формировал благоприятное микроокружение, стимулирующее прорегенераторную (M2) дифференцировку макрофагов. Помимо этого, материал также показал стимулирующее действие на остеогенную дифференцировку МСК костного мозга.

Однако несмотря на положительные результаты в рассмотренных выше работах в другом исследовании с применением доклинической модели дефекта критического размера было показано, что биокерамика, состоящая из дикальций фосфата и ГАп, более эффективна, по сравнению с такой же керамикой с добавлением коллагена, с точки зрения стабильности импланта и количества новообразованной КТ [Chang *и др.*, 2020]

Относительно композитов с добавлением ОКФ показано превосходство ОКФ/коллагенового композита в сравнении с аналогичными материалами на основе ГАп и β -ТКФ. Katakura и соавторы (2008) использовали композитный материал, добавляя коллаген к ОКФ, ГАп или β -ТКФ, и имплантировали его в дефект свода черепа крысы с последующими рентгенографическими и гистологическими исследованиями и обнаружили, что имплантированные композиты ОКФ/коллаген улучшают регенерацию кости в большей степени, чем костные графты из ГАп/коллаген и β -ТКФ/коллаген [Katakura *и др.*, 2008]. Было проведено несколько клинических испытаний с использованием ОКФ-материалов. ОКФ/коллаген помещали в полость носа и экстракционную лунку левого латерального резца верхней челюсти [Kawai *и др.*, 2014]. В течение 7-летнего периода наблюдения в местах лечения не наблюдалось инфекций или новообразований [Kim, Kim, Song, 2023]. Кроме того, не было подтверждено никаких отрицательных эффектов на соседние зубы, таких как подвижность или потеря, а сам композит правильно резорбировался и замещался новой КТ.

Стоит отметить, что центральной проблемой использования коллагена в составе композитного материала является его высокая биоразлагаемость, вследствие ферментативного разложения, и низкая механическая прочность [Rico-Llanos *и др.*, 2021; Toledano *и др.*, 2020]. При этом возможно контролировать скорость его деградации путем сшивания (кросс-фиксации) [Jiang *и др.*, 2022]. Однако стоит принимать во внимание, что в большинстве работ с использованием коллагеновых композитов используются коллагеновые гели, которые не обладают структурой и свойствами характерными для зрелого костного коллагена, вследствие чего данные материалы можно назвать биомиметическими весьма условно.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Культуры клеток

Эмбриональная мезенхимальная клеточная линия мышей СЗН/10Т1/2 была получена от АТСС (American Type Culture Collection, Манассас, США). Клетки культивировали в Basal Medium Eagle (Sigma-Aldrich, Милуоки, Висконсин, США), дополненном 10% инактивированной бычьей фетальной сывороткой (БФС) (Gibco, Уолтем, Массачусетс, США) и 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

Остеобластоподобные клетки человека, MG-63, были получены от АТСС (Манассас, Вирджиния, США). Клетки выращивали в питательной среде EMEM (Sigma-Aldrich, Милуоки, Висконсин, США) с добавлением 10% БФС.

Клетки острого миелоидного лейкоза человека линии ТНР-1 были получены из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% БФС.

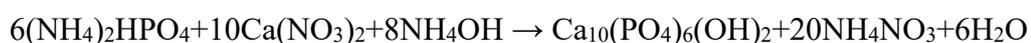
Все клеточные культуры культивировали в условиях CO₂-инкубатора (t=37 °С, φ(CO₂)=5%). С целью избежания контаминации в среду для культивирования дополнительно добавляли 80 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и 24 мкг/мл флюконазола.

В опытах использовали клетки 5–10 пассажей. Перед проведением исследований культуры клеток тестировали на отсутствие микоплазменной инфекции с использованием набора для обнаружения MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit.

2.1.2 Кальций-фосфатные материалы

2.1.2.1 Синтез и физико-химические свойства гидратированной кальций-фосфатной пасты, подвергшейся температурной обработке

Синтез гидратированной кальций фосфатной пасты, полученной с использованием высоких температур (гКФП-ВТ) проводилась в ФГБУН Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (Телешев А.Т., Горшенев В.Н. и соавт.) Процесс получения гидратированной кальций-фосфатной пасты (гКФП) осуществляли с использованием механоакустическая активация в роторно-пульсационном аппарате (ООО НПП «Авиатехника») по реакции осаждения гидроксиапатита:



Для удаления нитрата аммония как побочного продукта реакции применялась термическая обработка полученной суспензии частиц. Четырехкратная промывка с

применением центрифугирования и последующей сушкой при 120 °С в течении 3 часов, успешно удаляла нитрат аммония на что указывает отсутствие полос поглощения на ИК-спектре, характерных для нитрата аммония (полосы поглощения 1330, 820 см^{-1}) (Рис. 10А). Дзета-потенциала частиц полученного высокотемпературного гКФП (гКФП-ВТ) составлял порядка +5 мВ (Рис.10Б).

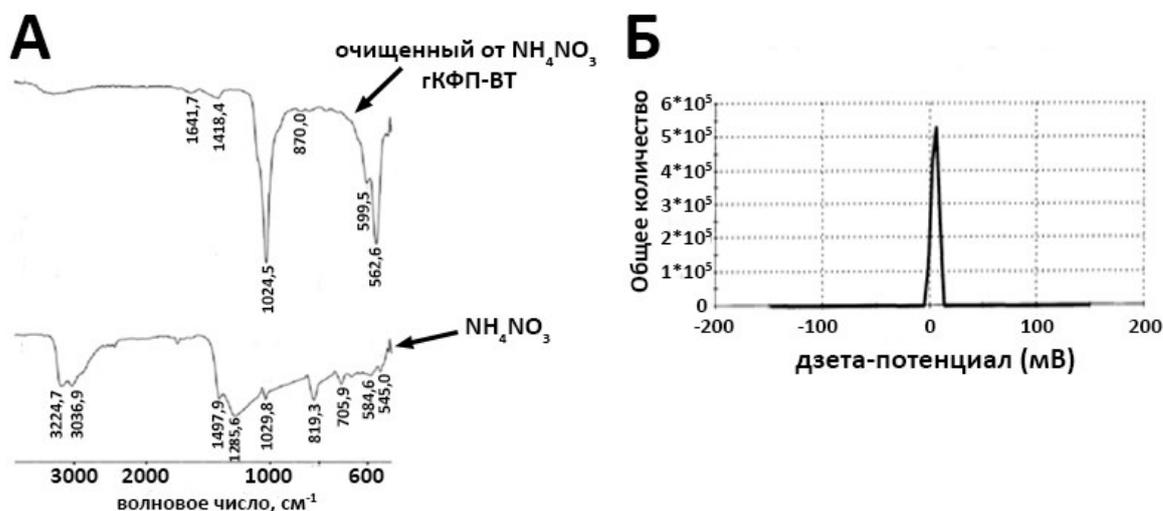


Рисунок 10 – ИК-спектры нитрата аммония (NH_4NO_3) и очищенного от него гКФП-ВТ (А) и дзета-потенциал гКФП-ВТ после очистки (Б)

При исследовании фазового состава в материале была идентифицирована кристаллическая фаза гидроксиапатита с элементарной гексагональной ячейкой с размерами (Å): $a = 9,426$, $c = 6,885$ (Рис. 11) [Телешев и др.].



Рисунок 11 – Дифрактограмма подвергнутого температурной обработке гКФП (А) и экспериментальные значения углов (2θ), относительных интенсивностей (I_0) и межплоскостных расстояний (d/n) для дифрактограммы гКФП-ВТ (Б)

Экспериментальные характеристики рентгеновского спектра ГАп приведены в Рис. 11Б. Результаты указывают на наличие не только кристаллической, но также сохранение и аморфной фазы после температурной обработки.

2.1.2.2 Синтез и физико-химические свойства низкотемпературной гидратированной кальций-фосфатной пасты

Для синтеза низкотемпературной гидратированной кальций-фосфатной пасты (гКФП-НТ) использовали жидкофазный метод осаждения ГАп из раствора. гКФП-НТ синтезировали путем смешивания 0,6 М фосфата аммония 1 М нитрата кальция при постоянном перемешивании с использованием верхнеприводной мешалки. Скорость перемешивания составлял 150-200 оборотов в минуту. Для поддержания значения pH в диапазоне от 10,5 до 11,0 применяли водный раствор аммиака [Teterina *и др.* 2021].

Температура реакционной среды составляла 20 °С. Полученный продукт синтеза представлял собой белую пасту, состоящую из мелкодисперсного порошка. Результаты измерений удельной поверхности порошков составили $80 \pm 0,5$ м²/г, и размер частиц гКФП-НТ, рассчитанный на основе этого параметра, находился в диапазоне 25–30 нм.

Для подтверждения реакции и фазового состава полученного материала образец гКФП-НТ был подвергнут высокотемпературной обработке при 1250 °С. На Рис. 12А представлены ИК-спектры соединения как до, так и после температурной обработки (спекания). При анализе осадка перед спеканием (образец-0) наблюдалась слабая поглощающая полоса ОН-группы при 3575 см⁻¹. Это указывало на низкую степень кристалличности порошка гидроксиапатита и высокое содержание аморфной фазы. Область спектра от 900 до 1100 см⁻¹ характеризовалась симметричными и асимметричными колебаниями группы PO₄³⁻ [Teterina *и др.* 2021]. Пики при 564 и 603 см⁻¹ принадлежат деформационным колебаниям Р-О (ν₄). Мода на 875 см⁻¹ может принадлежать как к группе HPO₄²⁻, так и к группе CO₃²⁻. Также регистрируются моды колебаний группы CO₃²⁻ на 1415 и 1458 см⁻¹. Пик при 1649 см⁻¹ указывает на присутствие адсорбированной воды.

После спекания наблюдалось появление острого пика ОН-группы при 3566 см⁻¹, свидетельствующего о повышении кристалличности образцов и наличии фазы ГАп. Пики фосфатных групп при 960-1100 см⁻¹ и 550-620 см⁻¹ остаются неизменными. Мода гидрофосфатной группы при 875 см⁻¹ снижается. Моды, принадлежащие CO₃²⁻ и адсорбированной воде, также уменьшаются.

Результаты рентгеноструктурного анализа (РФА) представлены на Рис. 12Б. Остаток до высокотемпературной обработки (образец-0) имел слабый пик поглощения ОН-группы при 3575 см^{-1} , что указывало на низкую степень кристалличности порошка ГАп и высокое содержание аморфной фазы. Спектральный диапазон от 900 до 1100 см^{-1} характеризуется симметричными и асимметричными колебаниями группы PO_4^{3-} . До спекания (образец-0) осадок был аморфным (или с небольшим размером кристаллитов), что приводит к перекрытию полуширины соседних пиков. Это приводит к затруднениям в определении фазового состава и индексации дифракционной картины. Некоторые наблюдаемые максимумы на рентгенограмме представляют собой суперпозицию нескольких пиков. Их показатели сравнивались с картой №84-1998 базы XRD ICDD (Powder Diffraction File, Alphabetical Index Inorganic Compounds, Pennsylvania: JCPDS, 1997) и представлены в таблице 2.

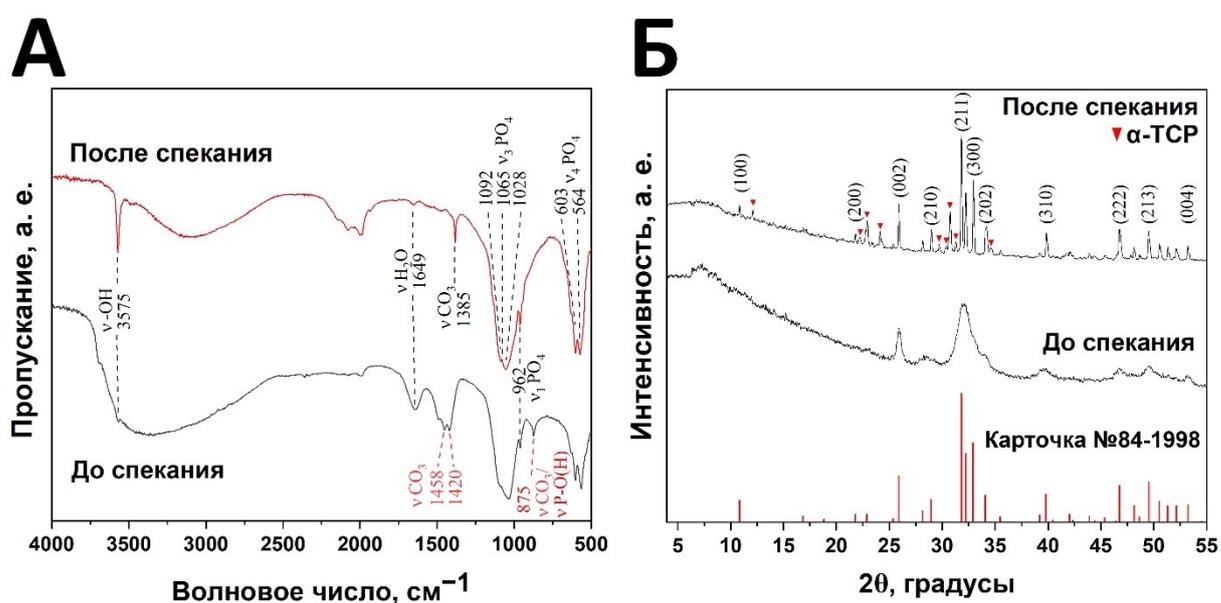


Рисунок 12 – ИК Фурье-спектры образцов гКФП-НТ после синтеза и обжига при 1250°C (А) и рентгено-фазовый анализ образцов гКФП-НТ при синтезе и после обжига при 1250°C (Б)

После спекания кристалличность образцов увеличилась, что позволило выделить две фазы: ГАп, соответствующую карточке №84-1998, и α -ТКФ, соответствующую карточке №29-359. Показатели рефлексов обеих фаз также представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Список пиков гКФП-НТ, наблюдаемых на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

Образец		ГАп (1250°С)		ГАп (1250°С)		α-ТКФ	
2θ	(hkl)	2θ	(hkl)	2θ	(hkl)	2θ	(hkl)
		10,86	100	55,98	322	12,11	031
		21,81	200	57,21	313	22,23	201
		22,93	111	58,31	204	22,77	-162
		25,39	201	58,88	330	23,38	-204
25,96	002	25,91	002	60,03	420	23,87	033
28,49	102, 210	28,16	102	60,49	331	24,14	-261
		28,99	210	61,76	421	24,31	043
32,07	211, 112	31,83	211	63,10	502	26,72	-334
		32,24	112	63,53	510	29,73	-361
33,40	300, 202	32,97	300	64,14	304	30,38	-191
		34,17	202	65,18	511	30,76	034
		35,53	301	66,51	422	31,30	-335
39,67	212, 310	39,24	212			34,62	400
		39,88	310			41,43	
		40,48	221			41,76	
		40,87	103				
		42,07	311				
		42,33	302				
		43,90	113				
		44,40	400				
		45,40	203				
46,83	222	46,79	222				
		48,16	312				
		48,71	320				
49,67	213	49,56	213				
		50,59	321				
51,51	410	51,37	410				
		52,17	402				
53,26	004	53,26	004				

Соотношения масс в конечном продукте рассчитывали по методу Чанга (корундовые числа). Образцы после спекания содержат около 44,2 % фазы α-ТКФ. Фаза α-ТКФ не видна в ИК-спектре, поскольку фосфатные группы имеют такие же частоты колебаний, как и в ГАп. По тому факту, что до отжига присутствовала группа HPO_4^{2-} (мода при 875 см^{-1}), предполагается, что первоначально из раствора выпадали две фазы: кальций-дефицитный гидроксипатит (КД-ГАп) $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$ и гидроксипатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Данные дифрактограммы КД-ГАп показывают, что данная фаза обладает аналогичной симметрией кристалла, пространственной группой и параметрами решетки, как и ГАп. Следовательно, она демонстрирует рефлексы, практически неотличимые от чистого ГАп. Однако вследствие низкой степени кристалличности образцов точное определение фазового состава осадка оказалось затруднительным [Teterina *и др.* 2021]. КД-ГАп имеет рефлексы с теми же индексами Миллера и почти под теми же 2 тета углами, что и ГАп. Единственное различие состояло в интенсивности этих рефлексов.

2.1.2.3 Синтез и исследование физико-химических свойств порошкообразных дигидрата дикальцийфосфата, октакальций фосфата и его Sr-замещенных модификаций

Синтез дигидрата дикальцийфосфат (ДКФД) и октакальций фосфата (ОКФ) осуществляли с использованием подхода низкотемпературной химической трансформации: первоначально синтезированный методом осаждения из раствора ДКФД инкубировали в буферных растворах, в которых происходило постепенное растворение и переосаждение октакальций фосфата.

Синтез ДКФД проводили химическим осаждением из водного раствора согласно реакции:



Соотношение концентраций реагентов (Ca/P) задают равным 1,00, концентрацию $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в реакционной взяли 1 моль/л, pH поддерживали на уровне 5,00-5,50. После осаждения полученную твердую фазу отфильтровывали на воронке Бюхнера, промывали дистиллированной водой, высушивали при 36°C до полного удаления химически не связанной воды. После сушки материал просеивали через сито 100 мкм и проводили его физико-химический анализ.

Исследование полученного низкотемпературным способом ДКФД методом РФА показало наличие на рентгеновской дифрактограмме материала рентгенографических максимумом, соответствующих (по данным картотеки JCPDS и программы WinXPow) ДКФД с химической формулой: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Рис. 13А). ИК-спектр ДКФД содержит полосы поглощения, характерные для данного материала. Отмечено наличие полос поглощения валентных (1135, 1060, 986 см^{-1}) и деформационных (653, 578, 527 см^{-1}) колебаний фосфатной группы, а также полос, характерных для колебаний воды (3531, 3484 см^{-1}) (Рис. 13Б).

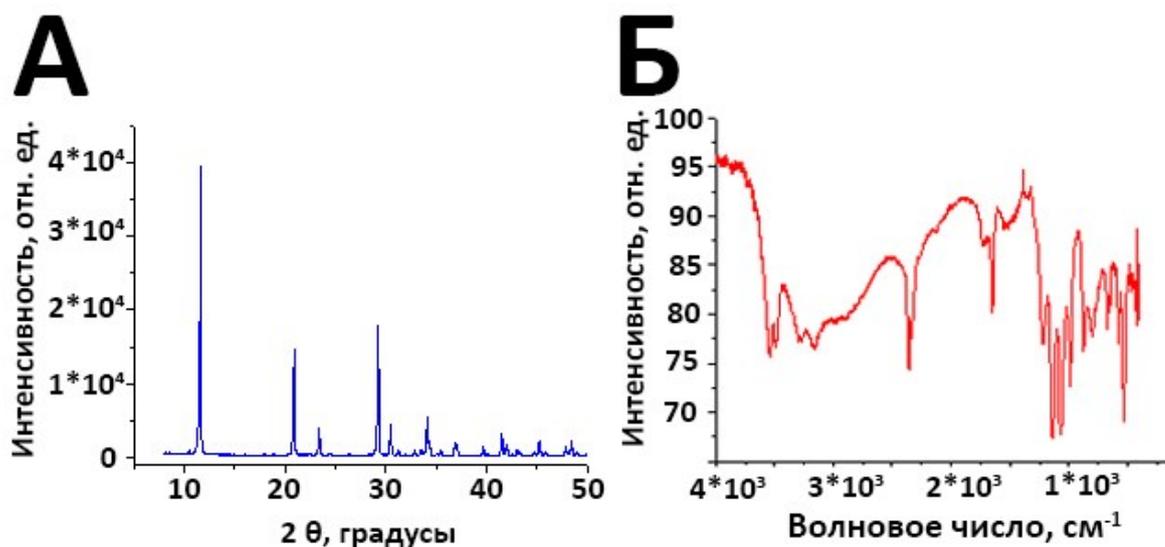


Рисунок 13 – Рентгенофазовый анализ ДКФД (А) и ИК-спектр ДКФД (Б)

Синтез ОКФ осуществлялся из ранее полученного ДКФД путем фазовых трансформаций под действием буферных растворов при физиологических температурах, не превышающих 37°C по реакции:



В результате процессов перекристаллизации и диффузии образуется структура ОКФ из исходного ДКФД (Рис.14). Данный процесс завершается полностью за 7 дней.

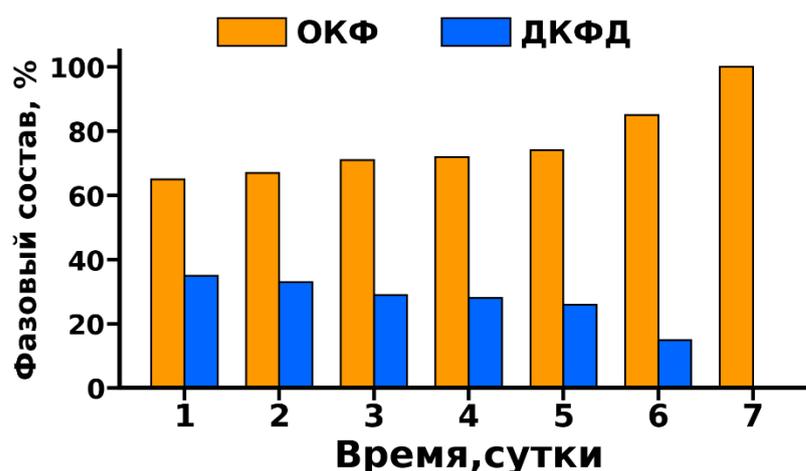


Рисунок 14 – График изменения состава материала в процессе трансформации ДКФД в ОКФ

Согласно результатам РФА на рентгеновской дифрактограмме ОКФ присутствовали рентгенографические максимумы, соответствующие (по данным картотеки JCPDS и программы WinXPow) ОКФ с химической формулой: $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – основная фаза

(Рис. 15А). ИК – спектр порошка ОКФ представлен на Рис. 15Б. Полосы с волновыми числами в интервалах 960–962 и 520–660 см^{-1} соответствовали ν_1 и ν_4 модам колебаний фосфатных групп, в диапазоне 1540–1300 см^{-1} полосы моды ν_3 колебаний характерны для CO_3 -групп, что является следствием частичного поглощения материалом углекислого газа из атмосферы.

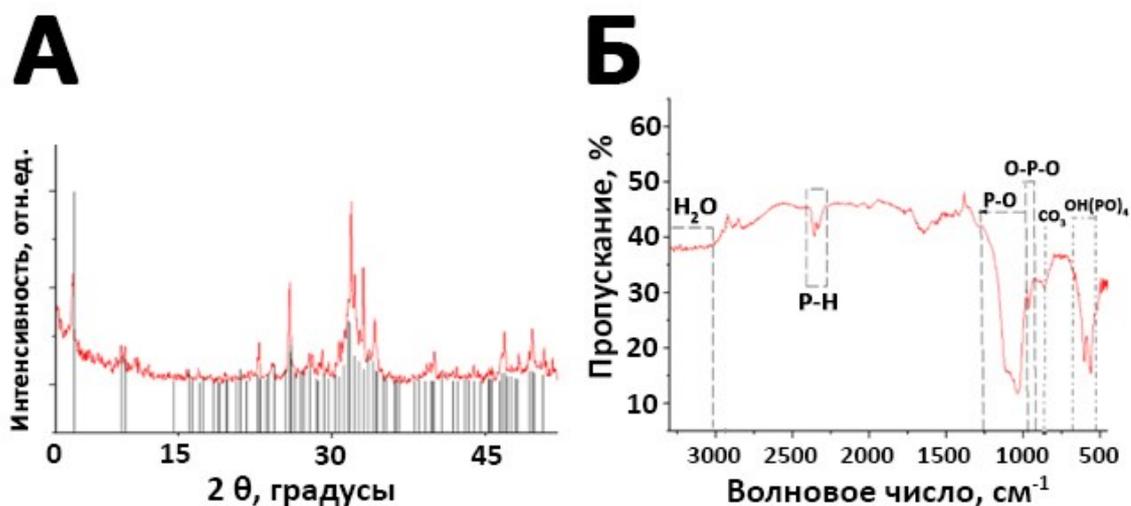
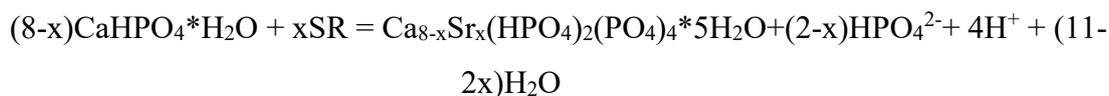


Рисунок 15 – Рентгенофазовый анализ ОКФ (А) и ИК-спектр образца ОКФ (Б)

ОКФ, в котором часть кальция была замещена стронцием (ОКФ-Sr), синтезировали методом низкотемпературной химической трансформации в 1,75 М растворе ацетата натрия из порошка ДКФД с добавлением в реакционную смесь нитрата стронция. После этого проводили фильтрацию и пятикратную промывку дистиллированной водой. Необходимое количество катионов стронция рассчитывали исходя из теоретического замещения катионов кальция в диапазоне от 1 до 50 ат.% по реакции:



Для значения $x=2$ замещение стронцием составило 25% от теоретического количества. Обозначение образцов соответствовало концентрации стронция, введенного в раствор в процессе приготовления порошка ОКФ [Teterina *и др.*, 2021]. В дальнейших исследованиях образцу ОКФ соответствует материал, без включения стронция в структуре, ОКФ-Sr_5 – включение стронция 5 ат.%, ОКФ-Sr_10 – включение стронция 10 ат.%, ОКФ-Sr_20 и ОКФ-Sr_50 – 20 и 50 ат.% соответственно.

Рентгенограммы полученных ОКФ и ОКФ-Sr представлены на Рис. 16. Установлено, что образцы представляли собой твердые растворы на основе пентагидрата октакальций фосфата ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и соответствовали карточке № 26-1056 базы ICDD. Основные дифракционные пики (около $4,9^\circ$ и $26,4^\circ$) смещались влево относительно исходного ОКФ

при увеличении в нем доли Sr. При этом угол сдвига также увеличивался с увеличением концентрации стронция в ОКФ. Дифракционные пики для всех исследованных образцов были уширены и наблюдались перекрывающиеся пики в дальних углах, что сопровождалось увеличением объема элементарных ячеек.

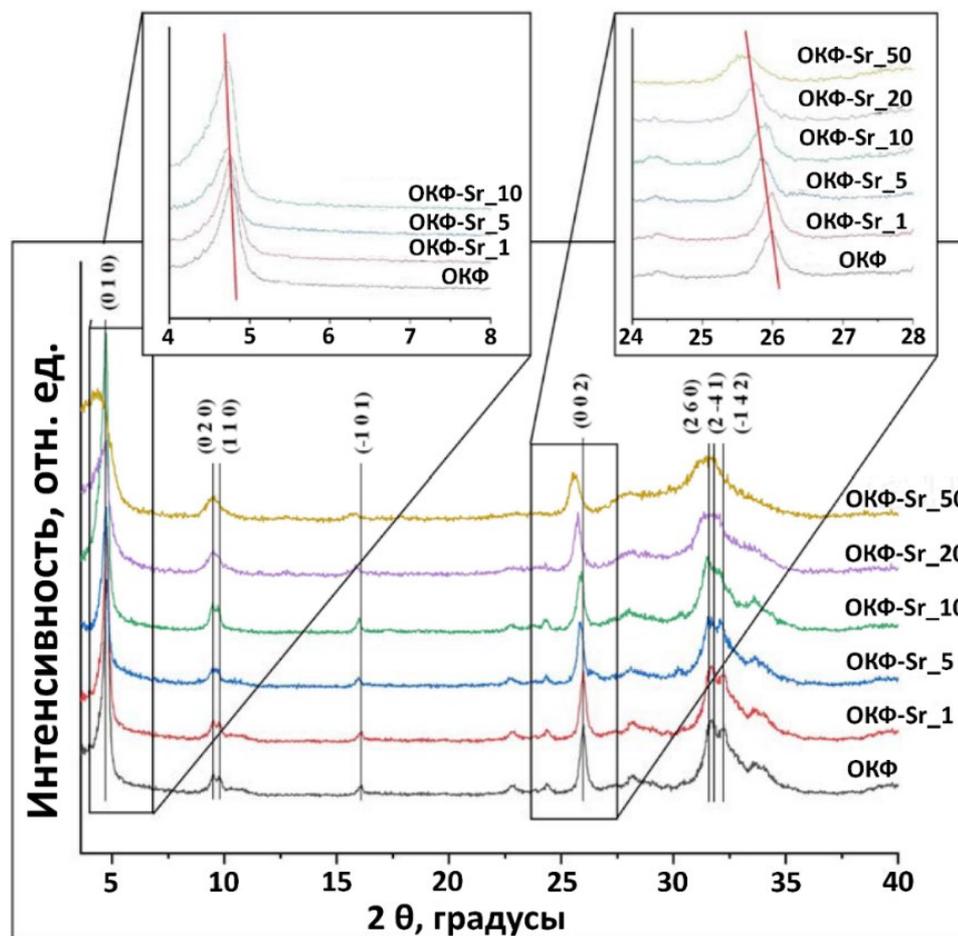


Рисунок 16 – Рентгенограммы образцов ОКФ и его Sr-замещенных вариантов

Параметры ячейки решетки рассчитывали методом наименьших квадратов с использованием пакета программ PDXL от Rigaku (Токио, Япония) с использованием дифрактометрической базы данных PDF2. Значения параметров элементарных триклинных ячеек задавались с помощью программы CelRef для восьми отражений ((020), (110), (-101), (-211), (002), (260), (-1-42) и (070)). Полученные данные свидетельствовали о постепенном увеличении параметров кристаллической решетки с увеличением концентрации стронция (табл. 3). Дифракционные пики ГАп и ДКФД не были обнаружены, следовательно, полученные образцы являлись однофазными и соответствовали составу ОКФ.

Таблица 3 – Значения параметров элементарных ячеек в ОКФ и его Sr-замещенных вариантов (Стандартные отклонения представлены в скобках)

Образец	Карточка № 26-1056	ОКФ	ОКФ-Sr_1	ОКФ-Sr_5	ОКФ-Sr_10
a, Å	9,52(9)	9,44(1)	9,62(2)	9,62(3)	9,62(7)
b, Å	18,99(4)	18,99(2)	19,01(1)	19,01(7)	19,20(4)
c, Å	6,85(5)	6,84(6)	6,89(4)	6,92(3)	6,90(3)
α , °	92,33(0)	92,52(1)	93,11(5)	93,17(4)	92,19(2)
β , °	90,13(0)	90,15(1)	89,20(7)	89,19(6)	90,18(3)
γ , °	79,93(0)	80,01(4)	80,09(3)	80,08(2)	79,78(9)
V, Å ³	1220,5(7)	1220,5(6)	1240,2(6)	1240,2(2)	1238,2(2)

Данные, полученные методом ИК-спектроскопии, также подтверждали данные рентгенофазового анализа. Спектр инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье представлен на рисунке 17. Острые формы полос указывали на высокую степень кристалличности. Наличие интенсивных полос при 1123 и 1027 см⁻¹, соответствующих моде ν_3 HPO_4^{2-} и PO_4^{3-} [растяжение P-O в фосфате (PO_4^{3-}) и гидрофосфата (HPO_4^{2-})], и полосы HPO_4^{2-} при 906 см⁻¹ (растяжение P-O в HPO_4^{2-}) типичны для структуры ОКФ. Резкие полосы P-O 602 см⁻¹ и 560 см⁻¹ (деформация P-O в PO_4^{3-}), которые представляли собой моду ν_4 PO_4^{3-} . Полосы при 865 см⁻¹ и 960 см⁻¹ принадлежали группам растяжения HPO_4^{2-} (P-OH). Эти основные пики колебаний групп PO_4^{3-} и HPO_4^{2-} типичны для структуры ОКФ.

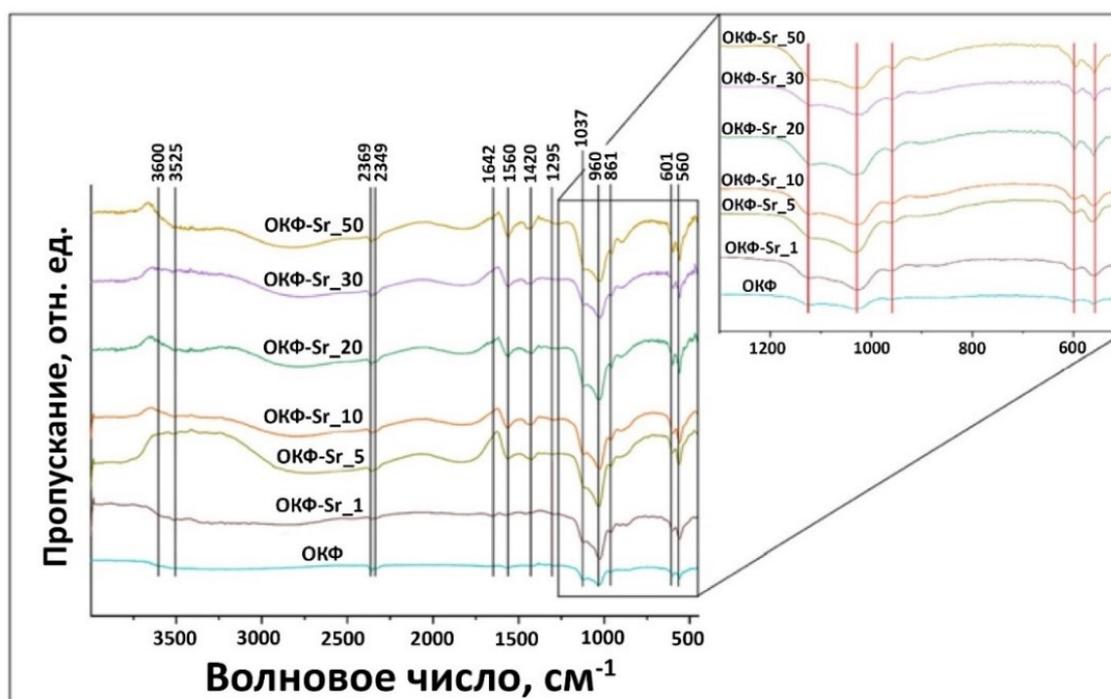


Рисунок 17 – ИК-спектры образцов ОКФ и его Sr-замещенных вариантов

Структуру и морфологию поверхности образцов ОКФ и ОКФ-Sr исследовали с применением метода СЭМ (Рис. 18). Во всех образцах наблюдалась собственная пластинчатая форма кристаллов ОКФ, при этом при с увеличением концентрации стронция в образцах происходило укрупнение кристаллов. На микрофотографиях выявлена наиболее кристаллизованная структура образцов (Рис. 18В,Г). С увеличением содержания стронция морфология становилась неравномерной; в случае ОКФ-Sr_50 кристаллы имели широкопластинчатую форму, шероховатые края и развитую поверхность.

При наименьшем содержании стронция (1 ат. %, 18Б), макроструктура кристаллов напоминала форму ДКФД, из которого синтезировали материал. Анализ микроструктуры образцов ОКФ-Sr_10 и ОКФ-Sr_20 выявил наличие двух типов морфологии частиц: пластинчатых частиц и частиц сложной формы. Образцы ОКФ-Sr_10 характеризовались структурами, состоящими из мелких кристаллов сложной формы [Teterina *и др.*, 2021].

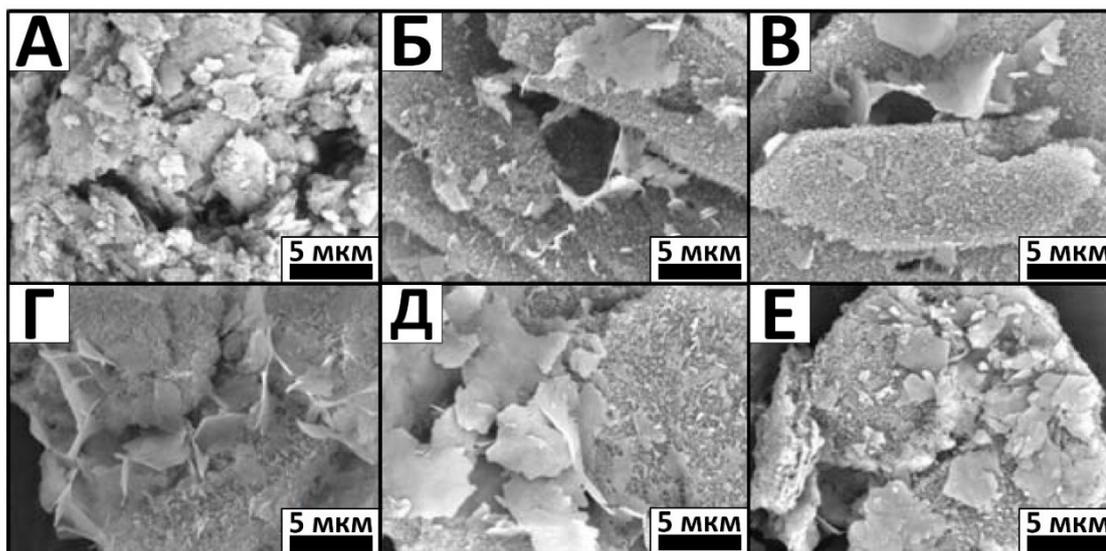


Рисунок 18 – Микрофотографии поверхности ОКФ и его Sr-замещенных вариантов. Сканирующая электронная микроскопия: (А) ОКФ; (Б) ОКФ-Sr_1; (В) ОКФ-Sr_5; (Г) ОКФ-Sr_10; (Д) ОКФ-Sr_20; (Е) ОКФ-Sr_50

Химический состав полученных материалов определяли с помощью анализа энергетической декомпозиции и рентгенофлуоресцентного анализа (Табл. 4). Результаты, полученные этими методами, подтверждают, что стронций встраивался в структуру материала в широком диапазоне концентраций. Полученные концентрации стронция, сравнимы с теоретическими, за исключением замены ОКФ-Sr_50. Молярное отношение Ca+Sr/P в образцах ОКФ-Sr_5 и ОКФ-Sr_10 достаточно близко к теоретическому значению 1,33.

Таким образом, выявлено, что стронций может повышать стабильность ОКФ в пределах определенных концентраций, выше которых он оказывает негативное влияние на кристалличность структуры.

Таблица 4 – Химический состав образцов ОКФ и его Sr-замещенных вариантов, ат.%. ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, РФА – рентгенофлуоресцентный анализ

Образец	ЭДС					РФА				
	P	Ca	Sr	Ca/P	Ca + Sr/P	P	Ca	Sr	Ca/P	Ca+Sr/
ОКФ-Sr_1	41,89	56,85	1,26	1,36	1,39	34,08	65,33	0,60	1,92	1,93
ОКФ-Sr_5	41,02	55,69	3,28	1,36	1,44	33,9	63,44	2,67	1,87	1,95
ОКФ-Sr_10	41,5	50,33	8,17	1,21	1,41	35,75	58,86	5,38	1,65	1,80
ОКФ-Sr_20	41,69	46,15	12,17	1,11	1,40	36,89	55,64	7,46	1,51	1,71
ОКФ-Sr_50	45,01	38,23	16,76	0,85	1,22	35,25	52,33	12,42	1,48	1,84

2.1.2.4 Низкотемпературный гидроксиапатит

Аморфный гидроксиапатит, полученный при низкой температуре (аГАп-НТ), представлял собой высушенный при 37 °С гКФП-НТ. Согласно данным РФА, кристаллической фазой продуктов синтеза является гидроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Рис. 19А) ИК-спектр порошка имеет полосы поглощения, характерные для карбонатсодержащих ГАп (Рис. 19Б). Поглощения при 3570, 1640 и 635 cm^{-1} соответствуют характерным для гидроксиапатита ОН-группам. Широкая полоса поглощения в интервале 2500-3700 cm^{-1} обусловлена наличием адсорбционной воды. Полосы с волновыми числами в интервалах 560-573, 600 и 961-963 cm^{-1} соответствуют ν_4 и ν_1 модам колебаний фосфатных групп. Полосы в интервале 1300-1650 cm^{-1} и 873-880 cm^{-1} соответствуют ν_3 и ν_2 модам колебаний карбонат-групп.

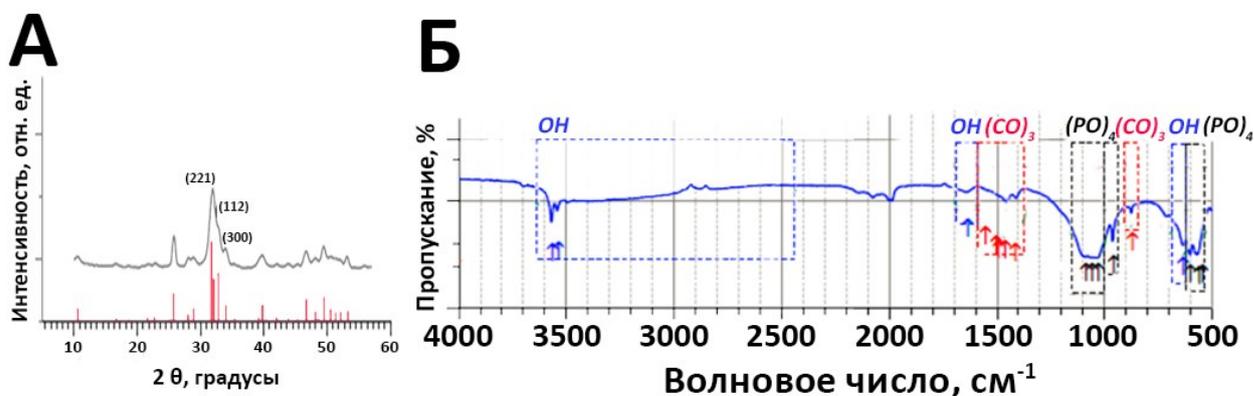


Рисунок 19 — рентгенофазовый анализ аГАп-НТ (А) и ИК-спектр аГАп-НТ (Б)

2.1.3 Деминерализованный костный матрикс

Деминерализованный костный матрикс (ДКМ) получали по авторской методике (патент RU 2686309 С1, 25.04.2019). Многоэтапная обработка ксеногенной губчатой костной ткани взрослых быков включала полную децеллюляризацию и щадящую деминерализацию костной ткани с максимальным сохранением структуры и микроархитектоники фибриллярного коллагенового матрикса.

После проведения всех необходимых процедур были получены децеллюляризованные и деминерализованные трехмерные пористые костно-коллагеновые блоки с размерами в осевом направлении 5*5*5 мм.

Для опытов *in vitro* и *in vivo* полученные блоки дополнительно стерилизовали инкубацией в стерильном фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с добавлением антибиотиков и антимикотиков: гентамицина сульфата (0,02 мг/мл) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, г. Миссури, США), флуконазол (0,04 мг/мл) (Pfizer, Париж, Франция) и ципрофлоксацин (0,008 мг/мл) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) при отношении объема пробы к объему раствора 1:20. Блоки, помещенные в ФСБ с антибиотиками, инкубировали в течение 48 ч при постоянном перемешивании и температуре 37°C в шейкере-инкубаторе (Biosan, Рига, Латвия). После этого блоки трижды промывали в стерильном ФСБ, pH 7,4 в течение 24 часов.

2.1.4 Реминерализованный костный матрикс

Формирование КФС-покрытия осуществлялось путём инкубации ДКМ в растворе, содержащем 10% CaCl₂, 2 М ацетата натрия, 0,15 М L-глутаминовой кислоты с ортофосфорной кислотой, доведенной до pH = 5,5. Инкубацию ДКМ проводили в течение 48 часов при t=35±2 °C и постоянном малоинтенсивном перемешивании в шейкере-инкубаторе. При длительной выдержке в растворе происходило равномерное осаждение ДКФД по всей поверхности матрикса с образовыванием большого количества центров кристаллизации и их последующего активного роста. Равномерность осаждения ДКФД из инкубационной смеси на ДКМ достигалась непрерывным перемешиванием растворов, а также применением проточной системы постоянной циркуляции раствора через ДКМ.

На Рис. 20А представлена данные ИК-спектроскопии покрытий ДКФД. Полученные результаты хорошо согласуются с ранее опубликованными литературными данными [Mevellec *и др.*, 2013] (Рис. 20А). ИК-спектр ДКФД показывает характерные пики, которые появляются около 3541, 3480, 3283 и 3166 см⁻¹. Данные пики представляют собой растяжение O–H молекул воды в решетке.

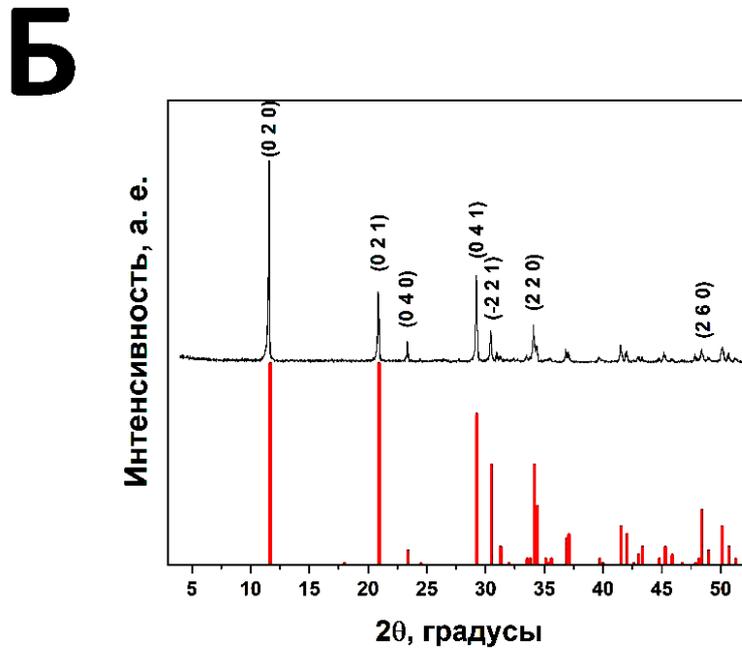
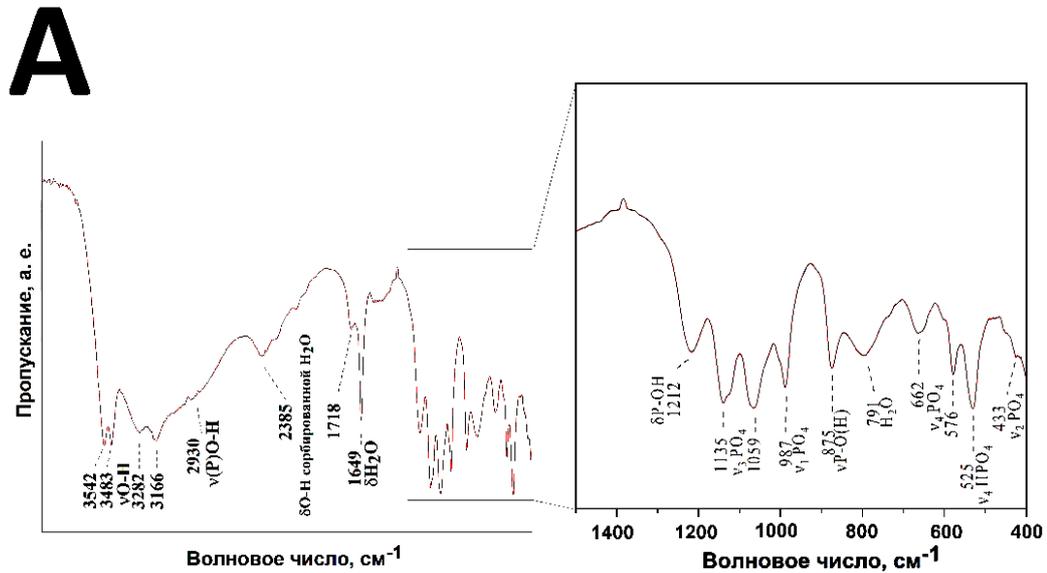


Рисунок 20 – Данные ИК-спектроскопии (А) и данные РФА (Б) покрытий ДКФД, полученных добавлением CaCl_2 в концентрации 2М

Полоса около 2930 см^{-1} принадлежит моде валентных колебаний $(\text{P})\text{O}-\text{H}$. При 1649 см^{-1} – колебание $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ изгиба молекул решетки. Мода при 1219 см^{-1} представляет собой плоскостную моду изгиба $\text{P}-\text{O}-\text{H}$. [Fadeeva *и др.*, 2023] Полосы 1135 , 1059 и 987 см^{-1} представляют моду растяжения $\text{P}-\text{O}$. Режим вибрации на частоте 876 см^{-1} представляет собой режим растяжения $\text{P}-\text{O}(\text{H})$. Мода колебаний 784 см^{-1} представляет собой внеплоскостной изгиб $\text{P}-\text{O}-\text{H}$. Мода колебаний воды – 662 см^{-1} . Полосы, возникающие при 576 и 525 см^{-1} , относятся к деформационным модам $\text{O}-\text{P}-\text{O}(\text{H})$.

Полученные данные ИК-спектроскопии для ДКФД хорошо согласуются с результатами, полученными методом РФА (Рис.20Б). Рентгенограммы полученного покрытия, подтверждающие, что осадок, образовавшимся при смешении растворов с мольным соотношением Са:Р 1:1, представлял собой ДКФД [Dorozhkin, 2019; Nair *и др.*, 2013]. Кристаллы ДКФД росли пропорционально основным плоскостям, а именно (021), (041) и (020). Рентгенограмма образца указывает на моноклинную структуру ДКФД. Рост кристаллов происходил в основном вдоль кристаллографической плоскости (020), о чем свидетельствует пик при 2-тета 11,7.

2.1.5 Экспериментальные животные

Эксперименты выполнялись на SPF (specific-pathogen-free – животные, свободные от патогенов) самцах крыс линии Wistar массой 180-200 г., полученные из Пущинского питомника лабораторных животных ФИБХ РАН. Все процедуры и манипуляции с животными были одобрены Комитетом по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБУН Филиала Института Биоорганической Химии и проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС.

2.2 Методы

2.2.1 Стерилизация кальций-фосфатных биоматериалов

Для исследований *in vitro* и *in vivo* все исследованные кальций-фосфатные материалы подвергались предварительной стерилизации путём инкубации в 70% этиловом спирте с постоянным перемешиванием на орбитальном шейкере в течение 3 часов. Затем открытые сосуды, содержащие материалы, оставляли сушиться в ламинарном шкафу БМБ-И-Ламинар-С-1,5 (Lamsystems, Россия) под ультрафиолетом при комнатной температуре до полного испарения этанола.

2.2.2 Исследование физико-химических свойства кальций-фосфатных биоматериалов

2.2.2.1 Рентгенофазовый анализ

Фазовый состав материалов определяли с использованием дифракционного анализатора Shimadzu XRD-6000, оснащенного автоматизированной системой обработки данных и идентификации фаз из базы данных JCPDS 2003. Рентгенофазовые исследования для общего фазового анализа проводились на порошкообразных образцах, высушенных в монохроматизированному излучению $\text{CuK}\alpha$ [Teterina *и др.*, 2021].

2.2.2.2 Рентгенофлуоресцентный анализ

Исследование качественного и количественного состава элементов в образцах ОКФ и его Sr-замещённых вариантов проводилось с использованием рентгенофлуоресцентного волнодисперсионного спектрометра последовательного типа BRUKER S8 Tiger (серия 2) в атмосфере гелия в соответствии с установленной методикой, используя программное обеспечение QUANT-EXPRESS (Берлин, Германия).

2.2.2.3 ИК спектроскопия

ИК спектры регистрировали на спектрофотометре Nicolet Avatar 330 (США) в диапазоне длин волн 4000-350 см⁻¹. Использовалась технология гранул KBr с 1 мг порошка в 50 мг KBr спектроскопической чистоты.

2.2.2.5 Сканирующая электронная микроскопия

2.2.2.5.1 Исследование поверхности материалов методом сканирующей электронной микроскопии

С Структуру и морфологию поверхности образцов КФС исследовали с применением метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием прибора Tescan VEGA II (Брно, Чехия), оснащённом системами энергодисперсионной спектроскопии (EDS; INCA Energy Oxford Instruments, Абингдон, Великобритания). Для предварительного покрытия образцы золотом использовали прибор Q150R Quorum Technologies (Льюис, Великобритания) [Teterina *и др.*, 2021].

2.2.2.5.2 Исследование клеточной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии

Для оценки морфологических особенностей поверхности клеток после 96 часов инкубации с КФС материалами клетки фиксировали в течение 24 часов в смеси 2% формалина и 0.2% глутаральдегида при комнатной температуре. Затем образцы трижды отмывали в ФСБ от фиксирующей смеси и осуществляли дегидратацию в растворах с возрастающей концентрацией спирта (30%, 50%, 70%, 82%, и 96%) по 5 минут дважды в каждом растворе. После этого образцы проводили через смесь спирта и ацетона 3:1, 1:1, 1:3 и в 100% ацетоне.

Для удаления влаги клетки заливали гексаметилксиланом (HMDS) (Sigma-Aldrich Миссури, США) в объёме, покрывающем образец, и оставляли на сутки до полного испарения. Затем проводили сканирующую электронную микроскопию.

2.2.2.6 Микрокомпьютерная томография

Микрокомпьютерную томографию (микроКТ) проводили на микротомографе Bruker «SKYSCAN 1275» (Германия), с разрешением 4,5 мкм, обеспечивающем детальный анализ морфологических и плотностных характеристик пористости и толщины материалов с использованием программного обеспечения Comprehensive TEX Archive Network (CT-an). Изображения были получены с шагом $0,73^\circ$ в каждом темпе, вокселем 13,76 мкм и дополнительно реконструированы с использованием программного обеспечения NRecon™ v.1.6.8.0, SkyScan, 2011 (Bruker micro-CT™, Kontich, Бельгия). При реконструкции применялись корректировки кольцевого артефакта и балочного упрочнения. После этого реконструированные изображения были повторно совмещены с использованием программного обеспечения Data Viewer™ 1.4.4.0 (Bruker micro-CT™, Kontich, Бельгия). Этот метод применялся для изучения свойств образцов и их внутренней архитектуры.

2.2.2.7 Измерение адсорбции белка

Для оценки способности КФС к адсорбции белка проводили инкубацию КФС в концентрации 10 мг/мл в растворе ФСБ с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки (БФС) в течение 24 часов. В качестве контроля использовался раствор ФСБ с 10% БФС [Teterina и др.]. Образцы инкубировались на орбитальном шейкере (S-3M A10, ELMi, Рига, Латвия) при 37°C и постоянном перемешивании со скоростью 21 оборот в минуту. После инкубации образцы центрифугировались в течение 5 минут при 5000 оборотах в минуту на центрифуге Universal 320R (Hettich, Вестфалия, Германия) для удаления частиц КФС. Концентрацию белка в супернатанте определяли методом Брэдфорда, измеряя оптическую плотность при длине волны поглощения 595 нм с использованием планшет-ридера Imark (Bio-Rad, Hercules, CA, США) [Bradford, 1976].

2.2.2.8 Измерение остаточной ДНК в деминерализованном костном матриксе и крошке

Содержание ДНК контроле (нативная кость) и образцах ДКМ и ДКК определяли методом адсорбционной спектроскопии. Для каждой группы образцов до и после децеллюляризации брали 10 мг фрагментов ткани и гомогенизировали в микропробирках с помощью микрогомогенизатора Merck (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA). Экстракцию ДНК из гомогената ткани проводили с использованием набора DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Лимбург, Нидерланды). В качестве контроля использовали пустую пробирку, с

которой проводили те же манипуляции, что и с опытными пробирками. ДНК в полученных растворах измеряли на спектрофотометре NanoVue Plus (Biochrom, Holliston, MA, USA) при 260 нм.

2.2.2.9 Измерение остаточного Ca^{2+} в деминерализованном костном матриксе и крошке

Содержание кальция в контроле (нативная кость) и образцах ДКМ и ДКК определяли методом абсорбционной спектроскопии. Образцы материала сушили в течение 12 ч при 90 °С в стерилизаторе горячим воздухом (Binder, Туттлинген, Германия), после чего измеряли сухую массу образцов. Затем каждый образец растворяли в 1 мл 1 М HCl в течение 24ч при 20–25°С. Количественное определение минерализованного кальция проводилось при помощи набора Calcium AS DiaS Arsenazo III (DiaSys, Holzheim, Germany). Оптическая плотность измерялась с использованием микропланшет-ридера Infinite F200 (Tecan, Маннедорф, Австрия). Значения минерализации кальция в образцах (в микрограммах Ca^{2+} /мг сухого веса образца) вычислялись в соответствии с рекомендациями производителя.

2.2.3 Методы исследований биологических свойств материалов

2.2.3.1 Анализ цитотоксического действия КФС на клеточные культуры

Количество живых клеток после их инкубации с КФС оценивали с помощью флуоресцентного красителя резазурина – редокс-индикатора на NADH/H⁺ (AlamarBlue, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США).

Клетки высевали в плотности $15 \cdot 10^3$ клеток/см² на поверхность культурального пластика. Через 24 часа культивирования среду заменяли на 100 микролитров среды, содержащей различные концентрации кальций-фосфатных соединений. Для оценки цитотоксичности использовались следующие концентрации КФС: 10, 3, 1, 0.3, 0,1, 0,03 и 0,01 мг/мл. Клетки культивировали с КФС в течение 24, 72 или 96 часов в зависимости от эксперимента. Затем к клеткам добавляли 100 мкг/мл резазурина и инкубировали их в течение 4 часов в условиях CO₂-инкубатора (t=37°С и уровне CO₂ 5%), после чего измеряли интенсивность флуоресценции полученного резоруфинового продукта. Интенсивность флуоресценции измеряли при длине волны возбуждения 560 нм и длине волны испускания 595 нм с использованием планшетного-ридера Infinity F 200 (Tecan, Маннедорф, Австрия). Количество живых клеток оценивали по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) полученного резоруфинового продукта. СИФ контрольных живых клеток, не

инкубированных с КФС, принимали за 100%. Количество живых клеток после инкубации с КФС рассчитывали в процентах относительно контроля в соответствии с формулой:

$$\text{Количество живых клеток, \% от контроля} = \frac{\text{СИФ клеток с экспериментальным воздействием}}{\text{СИФ контрольных клеток}} * 100\%$$

2.2.3.2 Анализ жизнеспособности клеток и степени их расплывания методом флуоресцентной микроскопии

Анализ жизнеспособности клеток и степени их расплывания методом флуоресцентной микроскопии зависимые либо независимые от прикрепления клеточные культуры высевали в количестве $1,5 \cdot 10^4$ клеток в 100 мкл полной питательной среды в 96-луночные планшеты (Corning Inc., Corning, NY, США). Через 24 ч культивирования среду заменяли на 100 мкл среды, содержащей кальций-фосфатные материалы в диапазоне концентраций 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 и 0,01 мг/мл, и продолжали культивирование в течение 24, 72 или 96 часов в зависимости от эксперимента. В контрольных условиях клетки культивировали на культуральном пластике в среде без добавления КФС. Через указанные сроки проводили анализ жизнеспособности клеток, а также морфологический анализ клеток.

Для оценки цитотоксичности КФС и морфологического состояния клеточной культуры проводили прижизненное окрашивание клеток флуоресцентными красителями. Для окрашивания ядер живых и мертвых клеток использовали 1 мкг/мл Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), для окрашивания ядер мертвых клеток – 1 мкг/мл йодидом пропидия (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), а для окрашивания цитоплазмы живых клеток – 2 мМ кальцеином АМ (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). После добавления красителей клетки инкубировались в условиях CO₂-инкубатора (температура 37 °С, содержание CO₂ 5%) в течение 30 минут после чего производили микроскопирование с использованием микроскопической станции Nikon Eclipse Ti-E. Перенос клеток и образцов в камеру микроскопа позволял поддерживать условия CO₂-инкубатора (температура 37 °С, содержание CO₂ 5%). Для анализа цитотоксичности был проведен подсчет количество живых и мертвых клеток в поле зрения с использованием программного обеспечения ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/> (по состоянию на 19 апреля 2022 г.)). Для анализа микроскопических изображений оценивали не менее 10 полей зрения.

2.2.3.3 Проточная цитотометрия

2.2.3.3.1 Измерение содержания кислых компартментов

Для оценки содержания кислых компартментов клетки высевали в плотности $1,5 \cdot 10^4$ клеток/см². Через 24 часа культивирования к клеткам добавляли КФС и культивировали ещё 96 ч. После этого клетки тщательно промывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) для удаления остатков КФС и открепляли от поверхности культурального пластика, используя 0,05% раствор трипсина-ЭДТА. Затем клетки окрашивали с использованием 75 нМ Lysotracker Green (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) на протяжении 30 минут в условиях CO₂-инкубатора (t=37 °C и содержании CO₂ 5%). В качестве положительного контроля продукции кислых компартментов часть клеток предварительно инкубировали с 50 микромолярным хлорохином в течение 4 часов, а затем также подвергали окрашиванию. Измерения производили с использованием проточного цитометра BD Accuri C6 (BD Sciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США).

Для каждого образца было проанализировано $3 \cdot 10^4$ клеток.

2.2.3.3.2 Измерение потенциала митохондриальной мембраны

Для оценки влияния КФС на потенциал митохондриальной мембраны ($\Delta\Psi_m$) клетки высевали в плотности $1,5 \cdot 10^4$ клеток/см². Через 24 часа культивирования к клеткам добавляли КФС и культивировали ещё 96 ч. Затем клетки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) от частиц КФС и открепляли от поверхности культурального пластика с использованием 0,05% раствором трипсин-ЭДТА (Gibco, Уолтем, Массачусетс, США) и окрашивали 10 нМ 3,3'-дигексилосакарбозианин иодидом (DiOC6(3)) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в течение 30 минут в условиях CO₂-инкубатора. В качестве контроля сброшенного $\Delta\Psi_m$ клетки инкубировали с 250 нМ валиномицина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в течение 30 мин. Измерение потенциала митохондриальной мембраны производили с помощью проточного цитометра BD Accuri C6. Для каждого образца анализировались $3 \cdot 10^4$ клеток.

2.2.3.3.3 Измерение продукции внутриклеточных активных форма кислорода

Для оценки внутриклеточной продукции активных форм кислорода АФК клетки высевали в плотности $1,5 \cdot 10^4$ клеток/см². Через 24 часа культивирования к клеткам добавляли КФС и культивировали ещё 96 ч. По окончании инкубации клетки трижды промывали от частиц КФС раствором ФСБ, затем открепляли от поверхности культурального пластика с помощью 0,05% раствором трипсин-ЭДТА и окрашивали 20 М 20.70-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетатом (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис,

Миссури, США) в течение 15 мин в условиях CO₂-инкубатора (t=37 °C, φ(CO₂)= 5%) [Sabido и др., 2020]. В качестве контроля продукции АФК часть клеток инкубировали с 1 мМ перекиси водорода (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в течение 20 мин. Измерения флуоресценции анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri C6. Для каждого образца анализировали 3*10⁴ клеток.

2.2.3.4 Конфокальная микроскопия

2.2.3.4.1 Исследования цитотоксических и адгезивных свойств материалов

Для исследования адгезивных и цитотоксических свойств пастообразных материалов *in vitro* методом конфокальной микроскопии образцы наносили тонким слоем на покровное стекло в ламинарном шкафу БМБ-И-Ламинар-С-1,5 (Lamsystems, Россия). Покровные стёкла помещали в чашку Петри и производили посев клеток на поверхность стекла в плотности 1,5*10⁴ клеток/см². В случае деминерализованного костного матрикса и костной крошки материалы непосредственного помещали в чашку Петри, после чего также производили посев клеток в плотности 1,5*10⁴ клеток/см². В зависимости от эксперимента через 6, 24 или 96 часа от момента посева проводили цитотоксический тест и морфологический анализ адгезии и распластывания.

Цитотоксический тест и морфологический анализ адгезии и распластывания проводился при помощи прижизненного окрашивания клеток флуоресцентными красителями: 1 мкг/мл Hoechst 33342 (ядра живых и погибших клеток синего цвета), 1 мкг/мл йодида пропидия (ядра погибших клеток красного цвета) (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и 2 мМ кальцеина АМ (цитоплазма живых клеток зеленого цвета) АМ (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Окрашивание производилось в течение 20 минут в условиях CO₂-инкубатора (t=37 °C, φ(CO₂)= 5 %). После окрашивания покровные стекла и/или образцы перемещали в свежую культуральную среду и выполняли тест на цитотоксичность и морфологический анализ клеточной адгезии с применением конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Germany). Обработка цифровых изображений, полученных с конфокального микроскопа, осуществлялась с использованием программного обеспечения ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/> (по состоянию на 19 апреля 2022 г.)). Для анализа микроскопических изображений оценивали не менее 10 полей зрения.

2.2.3.4.2 Исследование содержания кислых компартментов и митохондриального потенциала

Для анализа содержания кислых компартментов и потенциала митохондриальной мембраны методом конфокальной микроскопии клетки были посеяны на покровные стекла в плотности $15 \cdot 10^3$ клеток/см². Через 24 часа культивирования на закрепленные и распластанные клетки добавляли КФС и культивировали ещё 96ч. После этого клетки трижды промывали раствором ФСБ для удаления КФС, и окрашивали кислотные компартменты и митохондрии 75 нМ LysoTracker Green (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и 200 нМ MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), соответственно. Дополнительно ядра клеток окрашивали 1 мкг/мл Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, Миссури, США). Окрашивание клеток проводили в течение 30 минут в CO₂-инкубаторе (t=37 °C, φ(CO₂)= 5 %).

После окрашивания клетки промывали сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) (Gibco, Уолтем, Массачусетс, США) и подвергались микроскопированию с использованием конфокального микроскопа TCS SP5.

2.2.3.5 Хирургические процедуры

Параметры биосовместимости (показатели биологической безопасности, оцениваемые по местной реакции окружающей ткани), а также наличие или отсутствие остеокондуктивности и остеогенный потенциал материалов *in vivo* изучали в модели их подкожной имплантации крысам в инфраскапулярную область спины. В случае необходимости подтверждения остеоиндуктивного и остеогенного потенциала материалов данная модель наилучшим образом отражает искомые эффекты, поскольку она обеспечивает результаты, инициируемые самим материалом, а не влиянием естественного костного микроокружения. Общеизвестно, что остеоиндуктивные материалы должны индуцировать формирование кости при имплантации в не костных участках, также известных как гетеротопические или эктопические участки [Barradas *и др.*, 2011; Danoux *и др.*, 2014; García-Gareta, Coathup, Blunn, 2015; Habibovic, Groot de, 2007; LeGeros, 2008]. Таким образом, подтверждение формирования кости *in vivo* в эктопических участках необходимо, прежде чем материал будет классифицирован как остеоиндуктивное и, тем более, как остеогенное. Таким образом, гетеротопическая модель имплантации (под кожу, в мышцу и т.д., но не в кость) является наиболее надежной как для выявления воспалительного и ангиогенного, так и остеоиндуктивного и остеогенного потенциала разрабатываемых материалов.

Имплантация образцов материалов проводилась под общей анестезией с использованием золетил-ксилазинового наркоза. Ксилазин (Interchemie, Нидерланды) и золетил (Virbac, Carros, Франция) вводили внутримышечно в концентрациях 13 мг/кг и 7 мг/кг, соответственно. Для имплантации исследуемых материалов выполняли поперечный разрез кожи шириной 1,5 см в дорсальной межлопаточной области и формировали подкожные карманы параллельно коже с помощью гладкого троакара с последующей имплантацией препаратов на глубину не менее 2 см от линии разреза. В контрольных условиях проводили аналогичную хирургическую процедуру, но без имплантации материала. Образцы имплантировали с полным интерстициальным контактом без рестрикционных камер или сеток. Размер имплантированных образцов составлял 1*1*0,5 см. Для послеоперационного восстановления животных подвергали нагревательной пластине до пробуждения.

Животные из каждой группы случайным образом разделялись для эвтаназии (протокол углекислого газа) в соответствии со сроком имплантации в зависимости от эксперимента. После гуманной эвтаназии для предотвращения аутолиза образцы имплантированных материалов с окружающими тканями реципиентного ложа сразу же промывали в течение 30 секунд холодным (14 °С) изотоническим раствором и фиксировали в течение 48 ч в нейтральном буферном 10% растворе формалина при соотношении объема фиксатора к объему ткани 30:1.

2.2.3.6 Гистологический анализ

После завершения фиксации фрагменты образцов материала с окружающими тканями промывали дистиллированной водой 3 раза по 3 минуты для удаления избытка фосфатов и помещали не менее чем на 12 часов в матричную среду для криотомии (Optimum Cutting Temperature, O.C.T.) состава Tissue-Tek (Sakura, Токио, Япония). Поперечные срезы образцов толщиной 9 мкм получали методом криотомии с использованием криотома (MEV SLEE medical GmbH, Германия). Окрашивание образцов проводили традиционным методом с использованием гематоксилина Майера и эозина Y, а также дифференциальное окрашивание кальциевых отложений ализариновым красным S (по методу МакГи-Рассела) и коллагеновых/неколлагеновых структур (трихромным методом Лилли) Микрофотографии окрашенных гистологических образцов были получены на микроскопической станции Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Токио, Япония) и обработаны с использованием программного обеспечения NIS Elements AR4.13.05 (Build 933). Цифровая обработка конфокальных фотографий осуществлялась с использованием программного

обеспечения ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/> (по состоянию на 19 апреля 2022 г.)). Для анализа микроскопических изображений оценивали не менее 10 полей зрения на срез.

2.2.4 Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовали языки программирования Python 3 (версия 3.9.16) и R (версия 4.3.0) в средах разработки Spyder (версия 5.4.1) и RStudio (версия 2023.03.0+386), соответственно, с использованием пакетов Pandas (версия 1.5.3), NumPy (версия 1.23.5), Scipy (версия 1.10.0) и PMCMRplus (версия 1.9.10). Во всех экспериментах использовались статистические выборки с не менее чем 4 наблюдениями ($n \geq 4$). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для сравнения двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни. Величина наблюдаемых эффектов оценивалась с использованием стандартизированной средней разницы (метод g Хэджеса).

Перед проведением множественных сравнений между группами данные предварительно тестировали на нормальность распределения и равенство дисперсий с использованием критериев Шапиро-Уилка и Брауна-Форсайта, соответственно. Для данных с ненормальным распределением использовали H-критерий Краскела-Уоллеса с последующим сравнением экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Данна с поправкой Холма. Для данных с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим сравнением экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Даннетта.

Графическое отображение полученных результатов выполнено при помощи языка программирования Python 3 (версия 3.9.16) с использованием пакетов Seaborn (версия 0.12.2) и Matplotlib (версия 3.7.0). Данные на графиках представлены либо как среднее значение \pm стандартное отклонение, либо в виде диаграмм размаха, на которых отражены минимальное и максимальное значения, а также 25-, 50 (медиана) и 75 %-ные квартили.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Исследование биосовместимости и биоинтеграции вариаций синтетических гидратированных кальций-фосфатных паст

3.1.1 Исследование цитотоксических свойств гидратированной кальций-фосфатной пасты, подвергшейся температурной обработке, *in vitro*

На сегодняшний день среди остеопластических материалов особую актуальность приобретает создание инъекционных биосовместимых, резорбируемых, остеокондуктивных и биоактивных костно-репарирующих паст или гелей для эффективного лечения дефектов костной ткани [Harrison *u др.*, 2021; Raucsi *u др.*, 2020; Subbiah *u др.*, 2023]. В сфере ортопедической и стоматологической хирургии инъекционная форма обладает значительными преимуществами, так как она удобна в использовании для хирургов и вызывает минимальный дискомфорт у пациентов. Благодаря использованию канюлированной иглы или катетера материал можно легко доставлять в область костного дефекта. Кроме того, жидкая форма способствует равномерному распределению биологически активных молекул фосфата кальция в повреждённой области [Нао *u др.*, 2015; Zeimaran *u др.*, 2021]. Они могут использоваться в качестве малоинвазивных наполнителей для консолидации костных фрагментов или для проведения операций синус-лифтинга. Также они эффективны для заполнения дефектов костной ткани со сложной геометрией [Qu *u др.*, 2021]. Однако влияние физико-химических свойств подобных материалов на целевые параметры биосовместимости остается неизученным, что приводит к непредсказуемым и противоречивым результатам их применения в клинической практике. В данном блоке работ исследовали влияние температуры синтеза подобных материалов на адгезию, распластывание и жизнеспособность клеток при контакте с образцами ГАп-паст *in vitro* и их остеокондуктивные свойства *in vivo*.

В исследовании использовании гКФП, синтезированный в ФГБУН ИБХФ им. Н. М. Эмануэля РАН. (см. пункт 2.1.2.1) и прошедший термическую обработку (гКФП-ВТ), вследствие чего имеющую в своём составе как аморфную, так и кристаллическую фазы.

Одним из ключевых свойств, определяющих успешную биоинтеграцию остеопластических материалов в организме, является их остеокондуктивность, то есть способность обеспечивать беспрепятственную адгезию, миграция и пролиферацию клеток на своей поверхности. Вследствие этого на первом этапе было проведено исследование адгезии, распластывания и миграции клеток на поверхности гКФП-ВТ, а также его цитотоксических свойств, методом конфокальной микроскопии. Эти параметры были исследованы с использованием метода прижизненного окрашивания клеток. Для этого

применялись флуоресцентные красители: Hoechst 33342 (окрашивает ядра как живых, так и погибших клеток в голубой цвет), йодид пропидия (окрашивает ядра только погибших клеток в красный цвет) и кальцеин АМ (окрашивает цитоплазму живых клеток в зелёный цвет).

На рисунке 21 представлена микрофотография клеток через 96 часов культивирования на культуральном пластике и поверхности гКФП-ВТ.

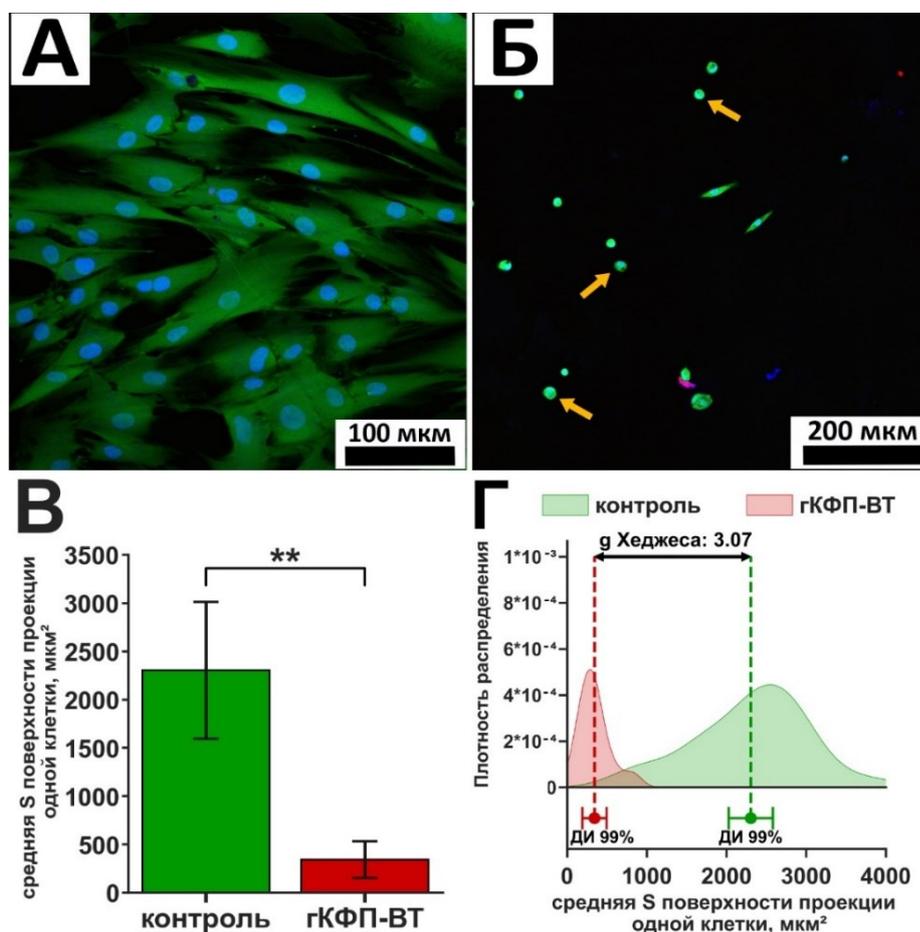


Рисунок 21 – Микрофотографии клеток, культивировавшихся в контрольных условиях (А) и на поверхности гКФП-ВТ (Б) (96 часов культивирования). Конфокальная микроскопия. Окраска Hoechst 33342 – ядра живых и погибших клеток синего цвета, йодид пропидия – ядра погибших клеток красного цвета, кальцеин АМ – цитоплазма живых клеток зелёного цвета. Контроль – культура клеток СЗН/10Т1/2 на поверхности культурального пластика; В – Сравнение средней площади проекции цитоплазмы одной клетки на культуральную поверхность сосуда, занимаемой в контроле (на культуральном пластике) и на поверхности гКФП-ВТ. Среднее ($n \geq 4$) \pm стандартное отклонение. ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни); Г – размер наблюдаемого эффекта как стандартизованная разница средних (коэффициент g Хэджеса) между S поверхности проекции клеток, культивировавшихся на гКФП-ВТ и на культуральном пластике. Коэффициент Хэджеса $> 0,8$ свидетельствует о большом наблюдаемом эффекте. Среднее ($n \geq 4$) \pm доверительный интервал (ДИ)

Видно, что в контрольных условиях (Рис.21А) отсутствовала клеточная гибель и все клетки имели нормальную морфологию, характеризующуюся вытянутой веретеновидной формой со средней площадью проекции цитоплазмы на культуральную поверхность сосуда 2304 ± 708 мкм² (Рис. 21В, Г). После 96 часов культивирования клеток линии СЗН10/Т1/2 на поверхности гКФП-ВТ наблюдалось значительно меньшее число прикрепленных клеток (Рис.21Б), по сравнению с контролем (на культуральном пластике). При этом у клеток, прикрепленных к поверхности гКФП-ВТ, не происходило нормального распластывания, и они приобретали шарообразную форму со средней площадью проекции цитоплазмы на культуральную поверхность сосуда 343 ± 189 мкм², что было в 7 раз меньше, чем в контрольных условиях (Рис. 21В, Г). У клеток на поверхности гКФП-ВТ материала также отмечалось уменьшение размера ядер, без нарушения целостности плазмалеммы. Это указывает на инициацию апоптотической гибели, одной из причин которой может быть нарушение адгезии клеток к материалу.

Вблизи гКФП-ВТ на поверхности культурального пластика не происходило гибели клеток и нарушения адгезии, однако наблюдалось нарушение морфологии клеток, выражавшееся в формировании вытянутых ламеллоподий (Рис. 22). Данный эффект мог быть связан с переносом частиц гКФП-ВТ во внешнюю среду и их взаимодействием с клетками.

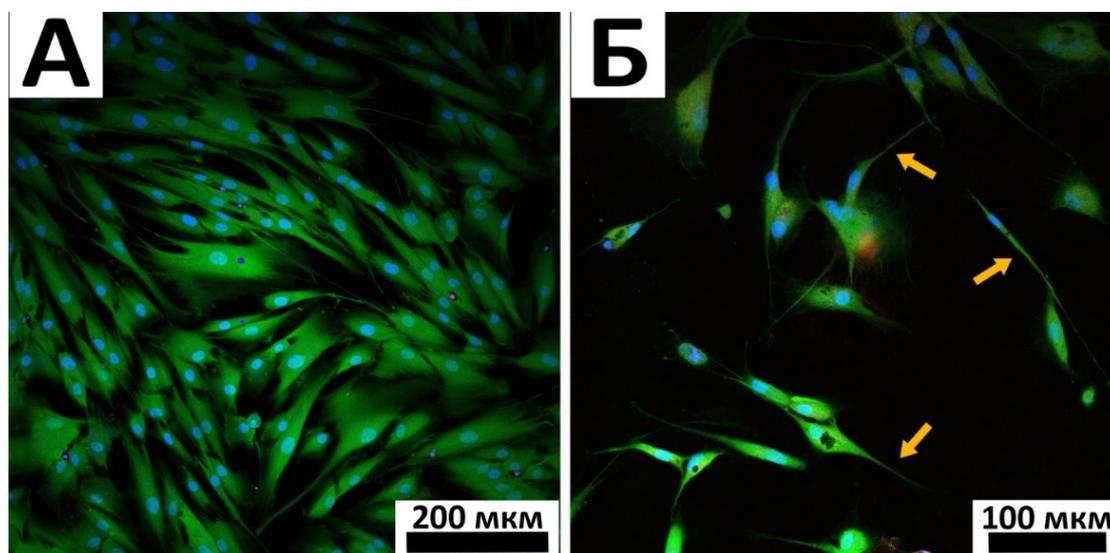


Рисунок 22 – Микрофотографии клеток, культивировавшихся в контрольных условиях (А) и возле гКФП-ВТ (Б). Конфокальная микроскопия. Окраска Hoechst 33342 – ядра живых и погибших клеток синего цвета, йодид пропидия – ядра погибших клеток красного цвета, кальцеин АМ – цитоплазма живых клеток зелёного цвета. Контроль – культура клеток СЗН/10Т1/2 на поверхности культурального пластика. Стрелками указаны микровыросты цитоплазмы клеток вблизи гКФП-ВТ

Таким образом, исследование *in vitro* гКФП-ВТ показало, что материал не проявляет osteoconductive свойства и не способен обеспечивать нормальную адгезию клеток на нем. При этом, возможно, клетки на его поверхности, вследствие нарушения адгезии вступают в апоптоз, вследствие чего материал проявляет контактную токсичность. Также материал оказывает стрессовое воздействие на закрепленные и распластанные клетки возле материала.

3.1.2 Исследование биосовместимости гидратированной кальций-фосфатной пасты, подвергшейся температурной обработке, *in vivo*

Полученные данные позволяют предположить, что гКФП-ВТ обладает ограниченной биосовместимостью вследствие нарушения адгезии клеток к его поверхности. Весьма вероятно, что подобный феномен может препятствовать миграции клеток в материал в организме, что, в свою очередь, будет ограничивать его osteoconductive свойства. С целью подтверждения данного предположения на следующем этапе была проведена гетеротопическая имплантация образцов гКФП-ВТ на срок 3 недели.

Для образцов гКФП-ВТ было затруднено получение гистологических срезов образцов, вследствие слияния материала в сплошной агломерат, блокировавший миграцию клеток и процессы неокостогенеза на нём. При этом для части образцов гКФП-ВТ наблюдалось развитие асептического воспаления и отторжение материала с формированием воспаленной рамолиционной кисты и чрезкожной фистулы (Рис. 23А).

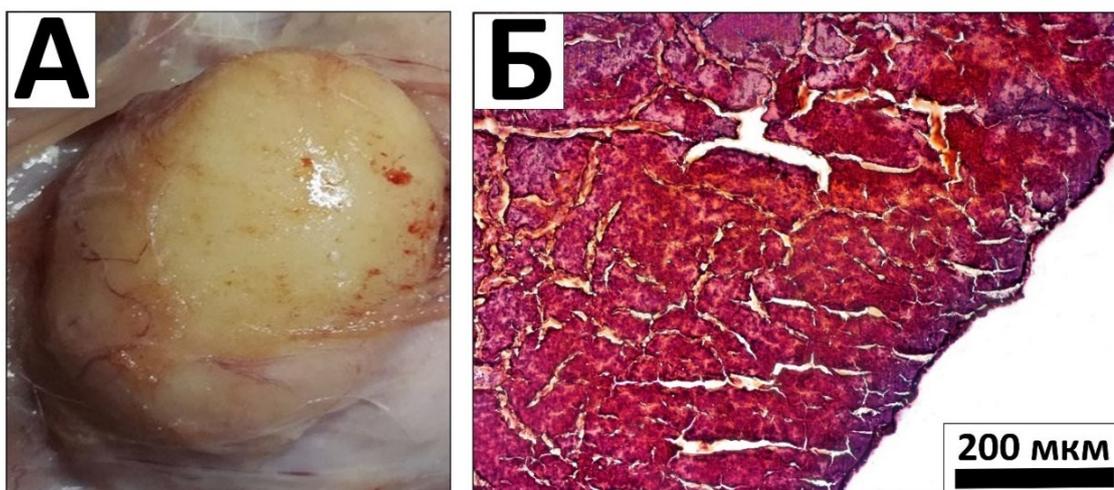


Рисунок 23 – Макроскопический вид рамолиционной кисты вокруг гКФП-ВТ (А) и микрофотография криосреза образца гКФП-ВТ после 3 недель гетеротопической имплантации (Б). Окраска по МакГи-Расселу: красным цветом окрашены отложения кальция

Гистологический анализ образцов гКФП-ВТ показал слияние материала в единый кальций-фосфатных агломерат, в котором не обнаруживались клетки и не происходило формирования фиброзной капсулы на всех исследуемых сроках имплантации (Рис.23Б). При окраске препаратов на кальций по МаГи-Расселу обнаружено, что кальциевые депозиты образовывали сплошной непреодолимый для клеток слой, блокирующий не только миграцию и пролиферацию данных клеток в материал, но и процессы инкапсуляции (т.е. неокколлагенеза) имплантированного материала.

Таким образом, полученные данные свидетельствовали о низкой биосовместимости гКФП-ВТ. Подобный эффект может быть связан с высокой температурной обработкой при синтезе данного материала вследствие которой происходило повышение его кристалличности. Как известно, взаимодействие материала с белками и клетками при регенерации костной ткани должно обеспечивать формирование остеогенного микроокружения в зоне дефекта костной ткани, что особенно важно в критически-размерных дефектах. При этом получаемая при помощи высокотемпературного спекания КФС-керамика не проявляет необходимую биоактивности вследствие высокой кристалличности и не способна резорбироваться даже остеокластами [Ginebra *и др.*, 2018]. Причины подобного феномена кроются в физиологических особенностях костной ткани. Известно, что высококристаллический нативный гидроксиапатит костной ткани помимо увеличения её прочностных характеристик, также выполняет функцию депо кальция в организме благодаря своей стабильности и нерастворимости. Стабильность гидроксиапатита позволяет избегать выхода большого количества ионов Ca^{2+} в среды организма при нормальных условиях. Только при определённых физиологических состояниях организма возможно растворение гидроксиапатита остеокластами и мобилизация Ca^{2+} с целью поддержания гомеостаза организма. Свободный Ca^{2+} является важным регулятором процесс построения и резорбции костной ткани, сдвигая его в ту или иную сторону. Высвобождение большого количество ионов Ca^{2+} ингибирует процесс резорбции костной ткани остеокластами и активирует её построение остеобластами [Kajiya, 2012; Viti *и др.*, 2016]. Вследствие этого свои остеоиндуктивные свойства КФС материал способен проявлять только при его растворении остеокластами и высвобождения необходимых ионов Ca^{2+} .

Таким образом, высококристаллические КФС-материалы не проявляют необходимой для регенерации костной ткани биологической активности и требуют модификации для повышения их остеогенных свойств.

3.1.3 Исследование цитотоксических свойств гидратированной кальций-фосфатной пасты, полученной низкотемпературным синтезом, *in vitro*

Следуя вышеизложенной логике, на следующем этапе представляло интерес исследование КФП с меньшим содержанием кристаллической фазы, полученного при комнатной температуре без дополнительной температурной обработки (гКФП-НТ). Материал получали методом жидкофазного синтеза ГАп путем осаждения из раствора без последующей термической обработки (см. пункт 2.1.2.2).

Известно, что на начальной стадии взаимодействия биоматериала с организмом происходит сорбция белков из тканевой жидкости на его поверхности [Wei *и др.*, 2014]. Результатом этого взаимодействия является формирование белковой оболочки («короны») вокруг частиц материала, которая может изменять его физико-химические и биологические характеристики. [Baі *и др.*, 2021; Miclăuș *и др.*, 2016]. Поэтому представляло интерес оценить сорбционную способность гКФП-НТ и сопоставить её с гКФП-ВТ. Для этого материалы культивировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем эквивалентное культуральной среде количество белка (10% бычьей фетальной сыворотки (БФС)), в течение 24 часов при температуре 37 °С.

При сравнении гКФП-НТ с гКФП-ВТ было обнаружено, что повышение кристалличности вследствие воздействия температуры приводило к уменьшению сорбционной способности материала. Так, сорбция белка для низкотемпературного гКФП-НТ составляла $90,5 \pm 4,83$ мг/г сухого вещества, в то время как для гКФП-ВТ $66 \pm 9,6$ мг/г сухого вещества (Рис. 24).

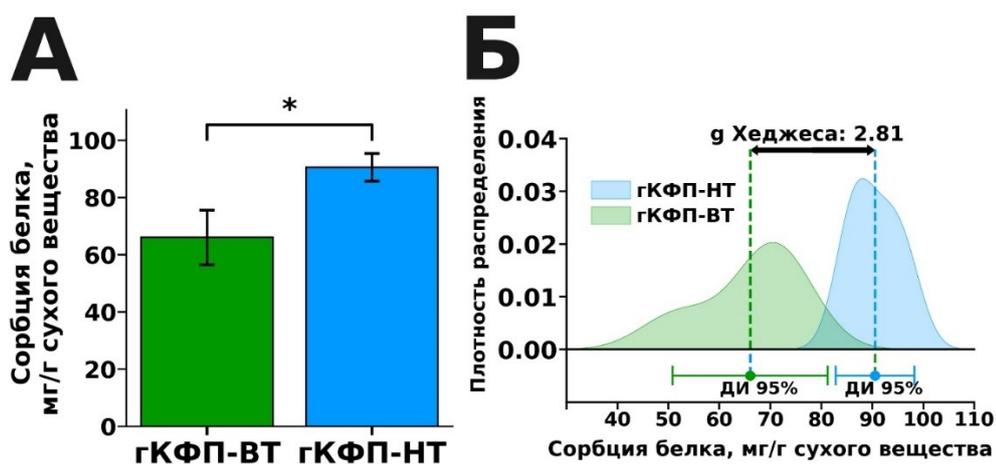


Рисунок 24 – Сорбция белка материала гКФП-ВТ и гКФП-НТ после 24 часов культивирования с ФСБ +10% БФС (А). Среднее ($n \geq 4$) \pm стандартное отклонение. * – $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни); Размер наблюдаемого эффекта разницы сорбции белка между материалами гКФП-ВТ и гКФП-НТ как стандартизованная разница средних (g Хеджес) (Б). Коэффициент Хеджеса $> 0,8$ свидетельствует о большом наблюдаемом эффекте. Среднее ($n \geq 4$) \pm доверительный интервал (ДИ)

По-видимому, уменьшение сорбционной способности материала вследствие температурной обработки приводит к снижению способности материала в регенеративные процессы, что согласуется с данными *in vivo* для гКФП-ВТ.

При оценке osteoconductive свойств гКФП-НТ через 6 часов культивирования клеток СЗН/10Т1/2 в контрольных условиях наблюдалось их полноценное распластывание с приобретением характерной веретеновидной морфологии и отсутствием погибших клеток (Рис. 25А).

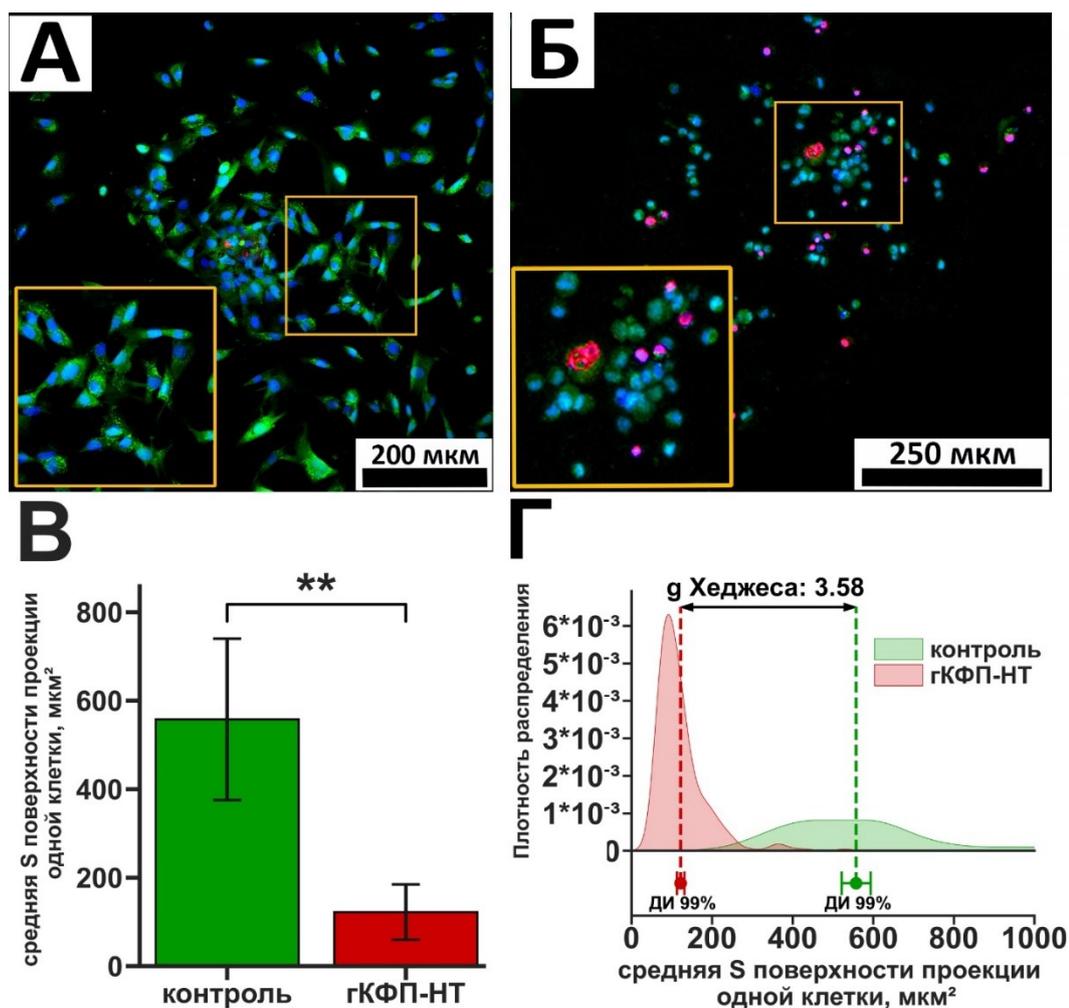


Рисунок 25 – Микрофотографии клеток, культивировавшихся в контрольных условиях (А) и на поверхности гКФП-НТ (Б) (6 часов культивирования). Конфокальная микроскопия. Окраска Hoechst 33342 – ядра живых и погибших клеток синего цвета, йодид пропидия – ядра погибших клеток красного цвета, кальцеин АМ – цитоплазма живых клеток зелёного цвета. Контроль – культура клеток СЗН/10Т1/2 на поверхности культурального пластика. В – сравнение средней площади поверхности 1 клетки на поверхности гКФП-НТ и культурального пластика. Среднее ($n \geq 4$) \pm стандартное отклонение. ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни); Г – размер наблюдаемого эффекта разницы между S поверхности проекции клеток, культивировавшихся на гКФП-НТ и на культуральном пластике, выраженная как стандартизированная разница средних (коэффициент g Хеджеса). Коэффициент Хеджеса $> 0,8$ свидетельствует о большом наблюдаемом эффекте. Среднее ($n \geq 4$) \pm доверительный интервал (ДИ)

Средняя площадь поверхности, занимаемой одной клеткой, составила $557,7 \pm 182,4$ $\mu\text{м}^2$ (Рис. 25В,Г) В отличие от контрольных условий, на поверхности гКФП-НТ, также как и подвергшейся температурной обработке гКФП-ВТ, клетки приобретали шарообразную форму с полным отсутствием ламеллоподий, со средней площадью занимаемой одной клеткой равной $122,17 \pm 62,36$ $\mu\text{м}^2$, что свидетельствовало о нарушении адгезии клеток к материалу (Рис. 25Б,В,Г).

Помимо этого, уже через 6 часов культивирования клеток на поверхности материала, наблюдалась клеточная гибель, составлявшая $33,9 \pm 3,4\%$ (Рис. 30).

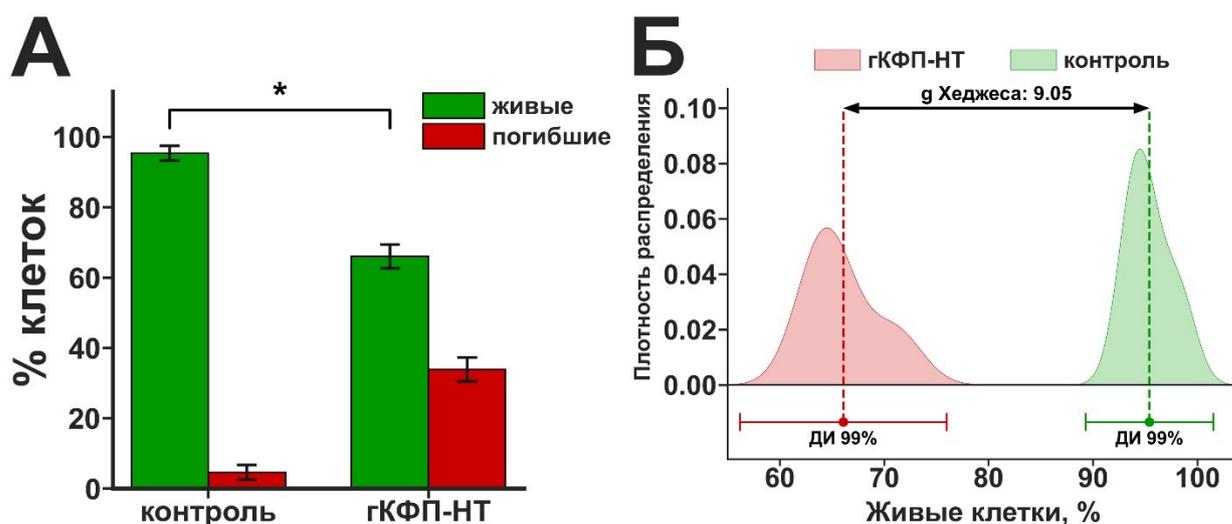


Рисунок 26 – Цитотоксический эффект гКФП-НТ через 6ч культивирования с клетками СЗН/10/Т1/2 (А). Среднее ($n \geq 4$) \pm стандартное отклонение. * – $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни); Размер наблюдаемого эффекта разницы в числе живых клеток, культивировавшихся на поверхности гКФП-НТ и культурального пластика, выраженная как стандартизированная разница средних (коэффициент g Хеджеса) (Б). Коэффициент Хеджеса $> 0,8$ свидетельствует о большом наблюдаемом эффекте. Среднее ($n \geq 4$) \pm доверительный интервал (ДИ)

Как видно из полученных данных низкотемпературный гКФП-НТ, также, как и подвергшейся температурной обработке гКФП-ВТ, не проявляет остеокондуктивных свойств *in vitro*. При этом уже через несколько часов культивирования на гКФП-НТ наблюдается клеточная гибель, которая может быть связана как с невозможностью прикрепления клеток к материалу, так и его контактной цитотоксичностью. Вследствие этого представляло дальнейшим интерес оценка цитотоксических свойств гКФП-НТ при культивировании в контакте с закреплёнными и распластанными на культуральном пластике клетками.

Результаты дозозависимой цитотоксичности пастообразного материала представлены на рисунке 27.

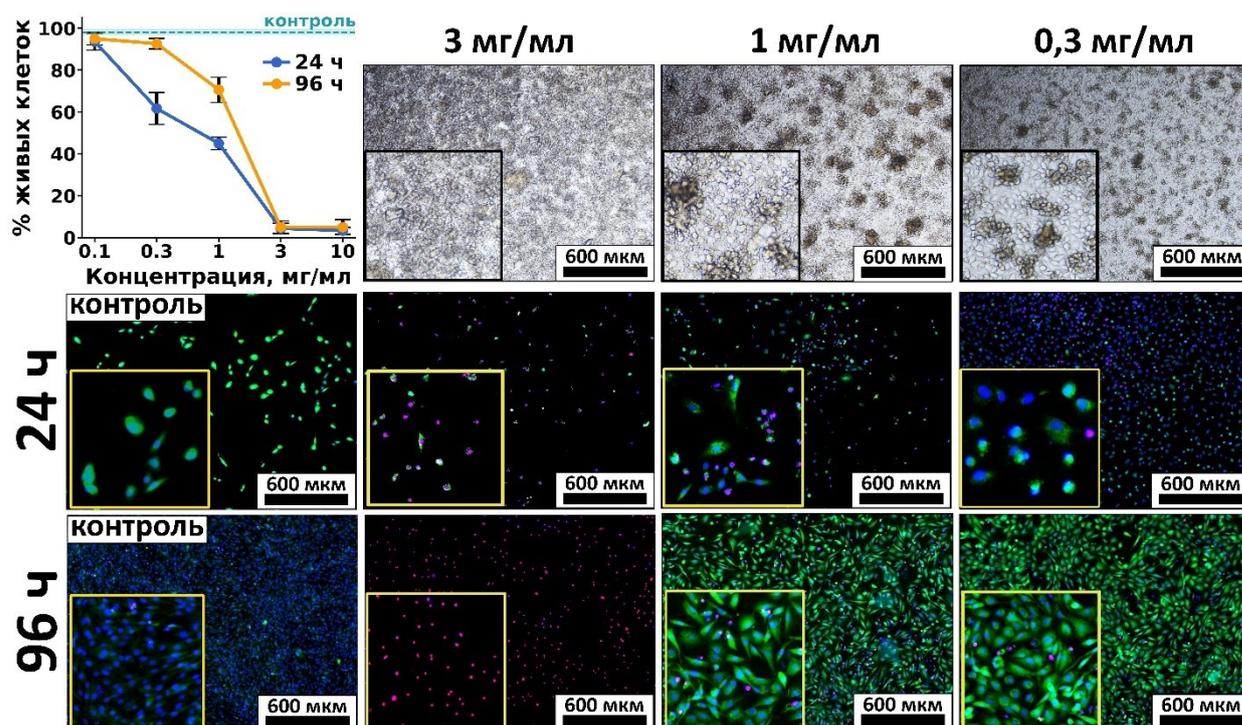


Рисунок 27. – Цитотоксическое действие гКФП-НТ, добавленной в клеточную культуру через 24 ч после посева клеток СЗН/10Т1/2 плотностью 15 тыс. клеток/см², после культивирования с ней в течение 24 и 96 часов. Световая и флуоресцентная микроскопии. Окраска Hoechst 33342 – ядра живых и погибших клеток синего цвета, йодид пропидия – ядра погибших клеток красного цвета, кальцеин АМ – цитоплазма живых клеток зелёного цвета. Контроль – культура клеток СЗН/10Т1/2 без добавления гКФП-НТ.

Полная гибель клеток после культивирования с частицами гКФП-НТ в течение 24 ч была обнаружена при концентрациях от 3 мг/мл и выше. После первых суток культивирования количество живых клеток, сравнимое с контролем, наблюдалось при концентрации 0,1 мг/мл (93,67±4,04%). После 96 часов культивирования наблюдалась гибель всех клеток при концентрациях 3 мг/мл и 10 мг/мл. В то же время при концентрациях 1 и 0,3 мг/мл через 96 часов наблюдалось большее количество живых клеток по сравнению с 24 часами культивирования, которое составило 70,67±6,02 и 92,70±2,52, соответственно. Это свидетельствовало о пролиферативной активности клеток. Выявленный дозозависимый цитотоксический эффект гКФП-НТ мог быть обусловлен наличием в составе материала аморфной фазы. Поскольку аморфная фаза характеризуется большей растворимостью по сравнению с кристаллической, существует вероятность высвобождения ионов Ca²⁺ в цитотоксических концентрациях при закислении клетками окружающей среды возле материала. Однако также стоит отметить, что наличие аморфной фазы (и свободных ионов Ca²⁺) в микроокружении материала в условиях *in vivo* гипотетически должно оказывать дифференцирующее действие на клетки-предшественники при имплантации гКФП-НТ в костное окружение. При этом высокая выживаемость клеток в присутствии

исследуемых материалов в концентрации от 1,0 мг/мл и меньше указывает на потенциальную возможность использования данного материала при определённой концентрации частиц.

3.1.4 Исследование биосовместимости и биоинтеграции гидратированной кальций-фосфатной пасты, полученной низкотемпературным синтезом, *in vivo*

Для оценки биологической безопасности, остеокондуктивности и остеиндуктивности гКФП-НТ *in vivo* была проведена гетеротопическая имплантация материалов на срок 3 недели, охватывающий одновременно как воспалительную, так и пролиферативную стадии регенеративного процесса в организме реципиента.

У контрольных животных, которым вводили физиологический раствор на всех сроках имплантации в месте инъекции не наблюдалось признаков воспаления (Рис. 28А).

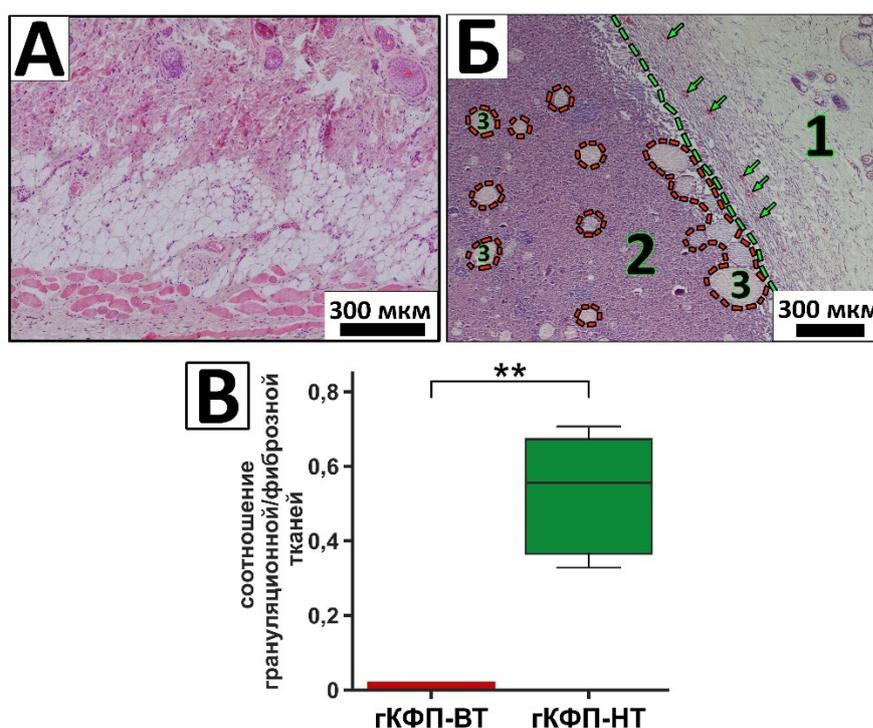


Рисунок 28 – Микрофотографии криосрезов образцов гКФП-НТ после 3 недели гетеротопической имплантации крысам сроком. **А** – контроль (подкожное пространство без материала); **Б** – образцы гКФП-НТ через 3 недели имплантации. **А,Б** – Окрашивание гематоксилином и эозином: ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты - в красный цвет, мышечная ткань – в розовый цвет. 1. – фиброзная капсула; 2. – гКФП-НТ; 3. – агломераты гКФП-НТ; Стрелки – кровеносные сосуды. Зеленый пунктир – граница капсулы между гКФП-НТ и окружающими тканями. Красный пунктир – агломераты гКФП-НТ; **В** – график соотношения грануляционной/фиброзной ткани в образцах гКФП-ВТ и гКФП-НТ. Медиана ($n \geq 4$), интерквартильный размах, минимальное и максимальное значения ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни).

В отличие от высокотемпературной гКФП-ВТ, для образцов гКФП-НТ через три недели после имплантации наблюдалось формирование неоколлагеновой капсулы, насыщенной как незрелыми, так и дефинитивными микрососудами без признаков гибели клеток внутри волокон капсулы с её постепенным отделением от материала и активной (сплошь) миграцией клеток внутрь образцов (Рис. 28Б). Внутри капсулы наблюдалось формирование небольших рыхлых кальций-фосфатно-белковых агломератов с признаками физиологической резорбции данных депозитов мигрирующими клетками реципиента.

Полученные *in vivo* данные свидетельствуют о качественно более высокой совместимости с клетками и тканями реципиента аморфной низкотемпературной гКФП-НТ в сравнении с высококристаллической высокотемпературной гКФП-ВТ. Это согласуется с литературными данными о том, что получаемая при помощи высокотемпературного спекания КФС-керамика не обладает необходимой биоактивностью и не способна резорбироваться остеокластами вследствие высокой степени кристалличности [Ginebra *u др.*, 2018]. Интересно также и то, что биоинтеграции материала гКФП-НТ, выявленной *in vivo*, не препятствовал ни его потенциальный цитотоксический эффект, ни подавление клеточной адгезии к нему, обнаруженные *in vitro*. Сформированная при низкой температуре низкокристаллическая гКФП-НТ в отличие от высококристаллической гКФП-ВТ не агломерировала, подвергалась физиологической резорбции, не препятствовала миграции клеток и проявляла все признаки биобезопасности и остеокондукции.

3.2 Исследование биосовместимости и биоинтеграции *in vitro* и *in vivo* порошкообразных кальций-фосфатов-предшественников гидроксиапатита и их модификаций

3.2.1 Исследование цитотоксических свойств порошкообразных кальций-фосфатов – предшественников гидроксиапатита *in vitro*

Исходя из полученных в предыдущем параграфе данных видно, что кристаллический ГАп как конечная кальций-фосфатная фаза в кости не способен проявлять необходимую биологическую активность в организме. В связи с этим дальнейший интерес представляло исследование биологической совместимости предшественников гидроксиапатита костной ткани. Известно, что в процессе минерализации костной ткани гидроксиапатит образуется из аморфного фосфата кальция (амФК) через ряд промежуточных кальций-фосфатных фаз [Rey *u др.*, 2009]. Из-за своей неустойчивости аморфный фосфат кальция в ходе процессов гидролиза и кристаллизации поэтапно преобразуется в ГАп, проходя через промежуточные стадии. Этот механизм осаждения

известен как «закон стадий Оствальда-Люссака», который заключается в первичном образовании неупорядоченной и хорошо растворимой фазы, которая в результате ряда фазовых превращений трансформируется в малорастворимую и упорядоченную кристаллическую фазу [Gelli, Ridi, Baglioni, 2019].

В связи с этим дальнейшей интерес представляло исследование биологических предшественников гидроксиапатита *in vitro* и *in vivo* с целью определения наиболее биосовместимого КФС. Несмотря на то, что выделение отдельных кальций-фосфатных фаз в кости считается сложной задачей, есть данные, свидетельствующие об образовании при фазовом переходе амФК таких кальций-фосфатов как ДКФД и ОКФ [Rey *и др.*, 2009]. Помимо участия данных КФС в процессе минерализации костной ткани, они также используются в качестве биоматериалов. Оба КФС способны к трансформации *in vivo* в гидроксиапатит костной ткани, а для ОКФ в большом количестве работ также показаны ярко-выраженные остеоиндуктивные свойства. Использование ДКФД в качестве остеопластического материала затруднено вследствие его нестабильности и перехода а монетит в неводных среда, поэтому область его применения ограничена кальций-фосфатными цементами [Gelli, Ridi, Baglioni, 2019].

На основании вышесказанного для дальнейшего исследования использовались полученные низкотемпературным синтезом ДКФД и ОКФ, а также аморфный ГАп, полученный при низкой температуре (аГАп-НТ).

Исследование цитотоксических свойств выбранных КФС *in vitro* производилось с использованием двух клеточных линий: независимых от прикрепления моноцитоподобных клеток человека линии ТНР-1 и мышинных эмбриональных мезенхимальных клеток линии СЗН/10Т1/2. На рисунке 29 представлены результаты исследования цитотоксических свойств КФС на культуре моноцитоподобных клеток ТНР-1. Через 72 ч с момента посева клеток цитотоксический эффект при максимальной концентрации частиц 10 мг/мл наблюдался только для аГАп-НТ, где число живых клеток составило $24,36 \pm 4,5\%$. При этом аГАп-НТ не оказывал цитотоксического действия при других концентрациях.

Остальные КФС не оказывали существенного цитотоксического действия на клетки ТНР-1 во всё диапазоне исследованных концентраций. Однако стоит отметить, что для ДКФД и ОКФ наблюдалось меньшее общее количество клеток, по сравнению с контрольными условиями. Таким образом, можно предположить, что ДКФД и ОКФ могли оказывать цитостатическое влияние на культуру суспензионных клетки.

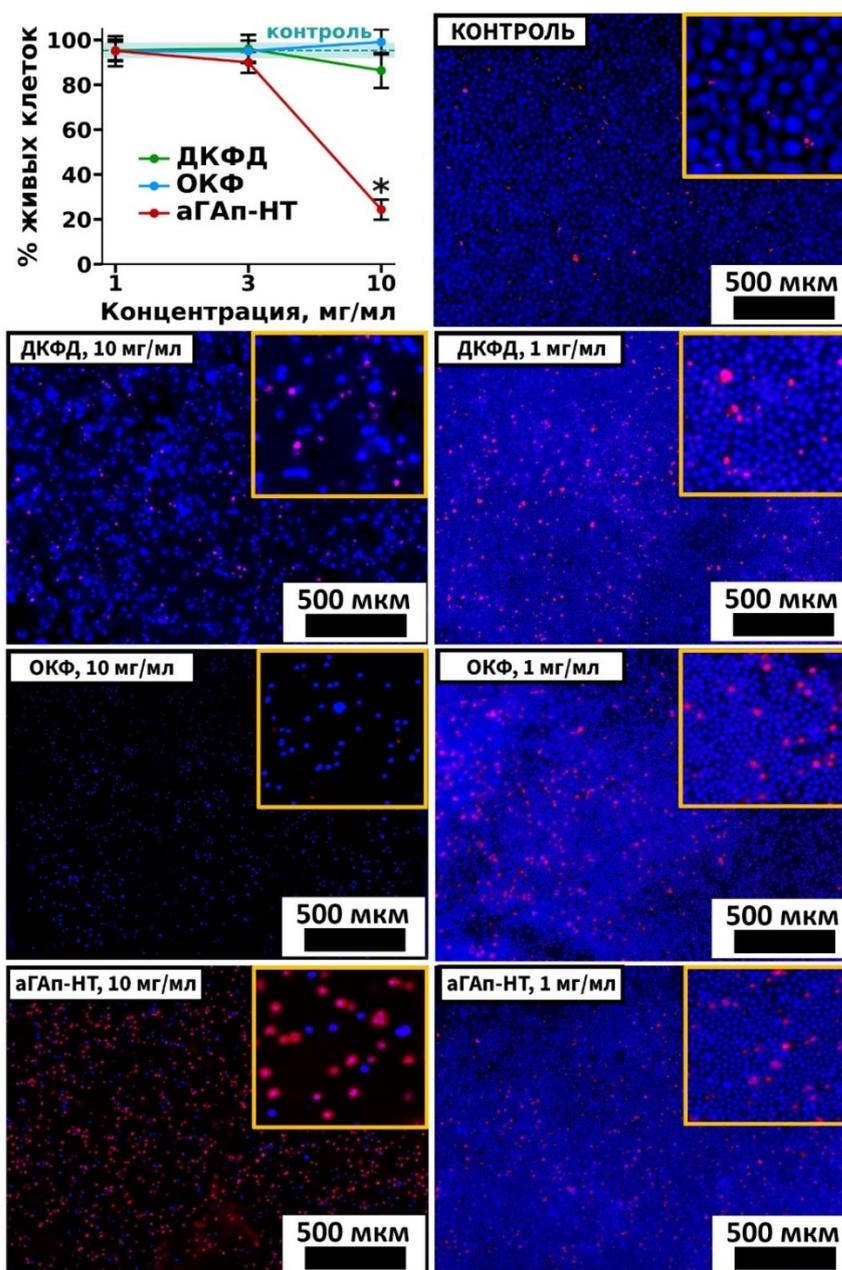


Рисунок 29 – Цитотоксический эффект КФС, добавленных в клеточную культуру через 24 ч после посева 15 тыс. клеток/см² независимых от прикрепления клеток ТНР-1, после 96ч культивирования клеток с ними. Среднее ($n \geq 4$) \pm стандартное отклонение. Микрофотографии указанных порошков КФС при концентрациях 10 мг/мл и 1 мг/мл на клетках ТНР-1 после 96 часов культивирования. Флуоресцентная микроскопия. Окраска Hoechst 33342 – ядра живых и погибших клеток синего цвета, йодид пропидия – ядра погибших клеток красного цвета. Контроль – культура клеток ТНР-1 без добавления КФС. * – $p < 0,05$ относительно контроля (Н-критерий Краскела-Уоллеса, сравнение экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Данна с поправкой Холма).

Через 96 часов культивирования, КФС проявили более выраженное токсическое действие на клетки СЗН/10Т1/2, которые зависят от прикрепления, по сравнению с клетками, ТНР-1 (Рис. 30).

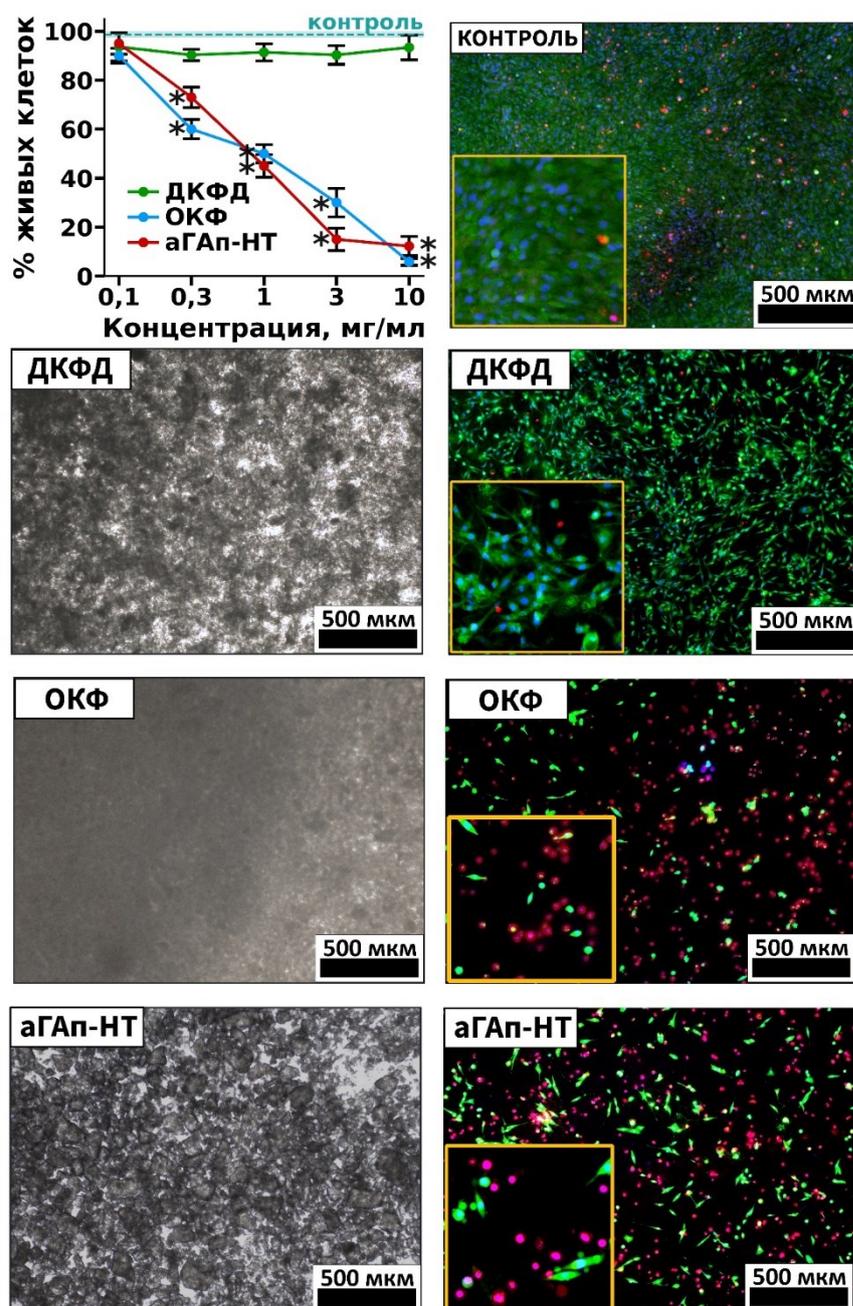


Рисунок 30. – Цитотоксический эффект КФС, добавленных в клеточную культуру через 24 ч после посева 15 тыс. клеток/см² зависимых от прикрепления клеток СЗН/10Т1/2, после 96ч культивирования клеток с ними. Среднее (n≥4) ± стандартное отклонение. Микрофотографии указанных порошков КФС при концентрации 10 мг/мл на клетках СЗН/10Т1/2 после 96 часов культивирования. Световая и флуоресцентная микроскопии. Окраска Hoechst 33342 – ядра живых и погибших клеток синего цвета, йодид пропидия – ядра погибших клеток красного цвета, кальцеин АМ – цитоплазма живых клеток зелёного цвета. Контроль – культура клеток СЗН/10Т1/2 без добавления КФС. * – p<0,05 относительно контроля (Н-критерий Краскела-Уоллеса, сравнение экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Данна с поправкой Холма).

Так, все исследованные КФС не проявляли цитотоксический эффект при концентрации 0,1 мг/мл. Наименьший цитотоксический эффект из всех исследованных КФС проявлял ДКФД, для которого даже при максимальной концентрации 10 мг/мл процент живых клеток составил $93,4 \pm 5\%$ живых клеток. Наиболее выраженный цитотоксический эффект КФС при максимальной концентрации наблюдался у аГАп-НТ и ОКФ ($12,2 \pm 4$ и $5,8 \pm 1,4$, соответственно), где обнаруживались только единичные живые клетки с нарушенной морфологией. При этом, обращая внимание на микроскопические фотографии клеток, видно, что при культивировании с ДКФД в концентрации 10 мг/мл число клеток было заметно меньше по сравнению с контрольными условиями и не достигало монослоя. Всё это указывает на стрессовое и цитостатическое воздействие КФС на клетки даже при отсутствии цитотоксического действия.

Данные, представленные на Рис. 30 показали, что высокорастворимый ДКФД был менее токсичен по сравнению с ОКФ и аГАп-НТ. Как известно, растворимость ДКФД и ОКФ на порядок и более выше растворимости ГАп ($PR(ДКФД)=10^{-6,73}$, $PR(ОКФ)=10^{-98,6}$, $PR(ГАп)=10^{-117,82}$ при $37\text{ }^\circ\text{C}$) [Wang, Nancollas, 2008]. Следовательно, цитотоксичность различных КФС нельзя однозначно связать с их растворимостью и кристалличностью. С другой стороны, тот факт, что независимые от прикрепления (неадгезивные к внеклеточному матриксу) клетки ТНР-1 менее чувствительны к цитотоксическому действию КФС, чем зависимые от прикрепления адгезивные клетки СЗН/10Т1/2, дает основание предполагать, что цитотоксичность КФС связана с их адгезивностью к клеткам. С целью проверки данного предположения было проведено исследование морфологии клеток после культивирования 96ч культивирования с 1 мг/мл ДКФД, ОКФ и ГАп методом СЭМ. Результаты показали, что для КФС характерна неспецифическая адгезия к клеточной поверхности (Рис. 31). Данный эффект был наиболее выражен у ОКФ и ГАп и в меньшей степени наблюдался для ДКФД.

Предполагается, что адгезия к клеточной поверхности является одним из возможных механизмом цитотоксичности кристаллических структур. Так, показано, что контакт кристаллов кремния и урата натрия с клеточными мембранами в отсутствие фагоцитоза может приводить к активации NLRP3 за счет притока ионов K^{+1} [Hari *и др.*, 2014]. Принимая во внимание повышение растворимости КФС в кислых условиях, можно предположить, что в зоне контакта КФС с мембраной происходит локальное увеличение $[Ca^{2+}]$ и $[Pi]$ до значений, оказывающих цитотоксическое воздействие. При этом данный путь во много остаётся неизученным и не показан для КФС частиц.

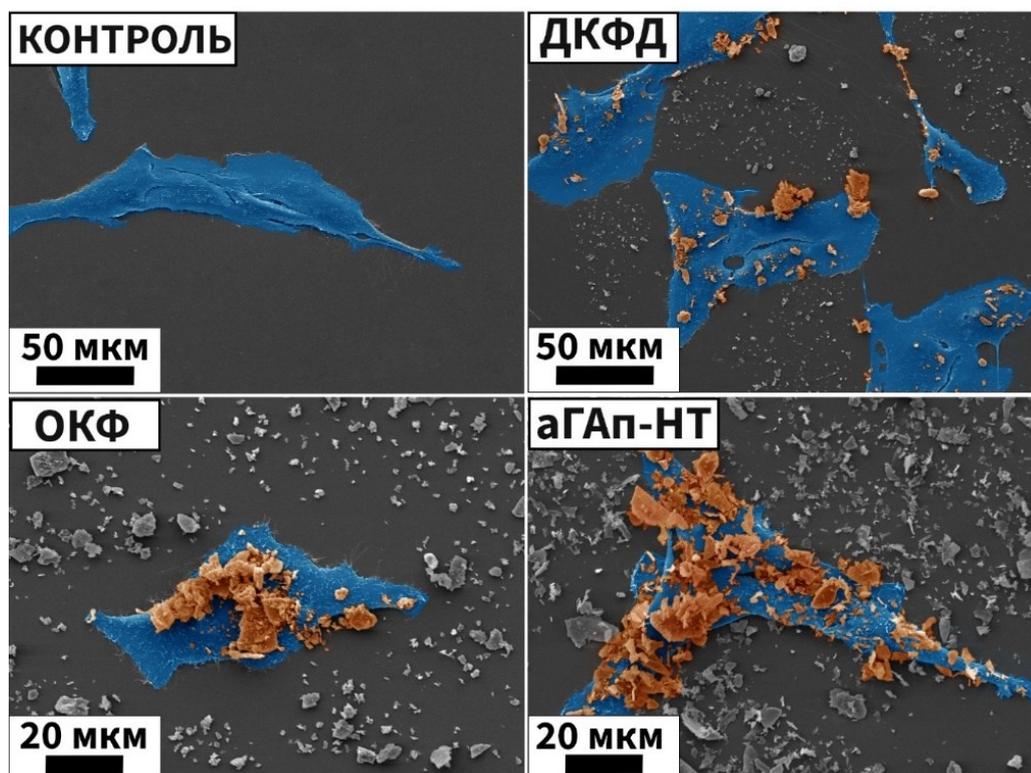


Рисунок 31 – Адгезия КФС к поверхности зависимых от прикрепления клеток C3H/10T1/2 через 96 ч совместного культивирования с ДКФД, ОКФ и ГАп. Синий цвет – клетки C3H/10T1/2, оранжевый – КФС на поверхности клеток. Сканирующая электронная микроскопия.

Также важно учитывать связь остеоиндуктивных свойств КФС с высвобождением ионов Ca^{2+} и P_i с последующим иницированием ими различных сигнальных каскадов в клетках костной ткани и их предшественниках. Возможно наблюдаемое слабое взаимодействие ДКФД с клеточной мембраной способствует с одной стороны оптимальному для проявления остеоиндуктивных свойств повышению концентрации ионов Ca^{2+} , а с другой – минимизации их цитотоксического эффекта.

3.2.2 Исследование биосовместимости порошкообразных кальций-фосфатов–предшественников гидроксиапатита *in vivo*

Для оценки параметров биосовместимости ДКФД, ОКФ и аГАп-НТ в условиях *in vivo* была проведена подкожная имплантация материалов крысам также на срок 3 недели. Гистологический анализ препаратов материалов, фиброзных капсул вокруг материалов и тканей периимплантного ложа отчётливо показал разницу в ответе на имплантируемые материалы (Рис.32).

Так вокруг ДКФД формировалась наиболее тонкая и рыхлая фиброзная капсула с признаками активной инволюции данной капсулы, свидетельствующие вкупе о

выраженных признаках биологической безопасности, биорезорбции и остеокондукции данного материала.

Вокруг ОКФ формировалась плотная многослойная фиброзная капсула без признаков слияния волокон, содержащая небольшое количество зрелых мелких кровеносных сосудов. При этом сами образцы ОКФ представляли собой агрегировавшие в плотный слой и практически бесклеточные агломераты с четкой каймой гистиолимфоцитарных клеток на периферии, но без обширного клеточного дебриса в структуре данных агломератов (Рис. 32).

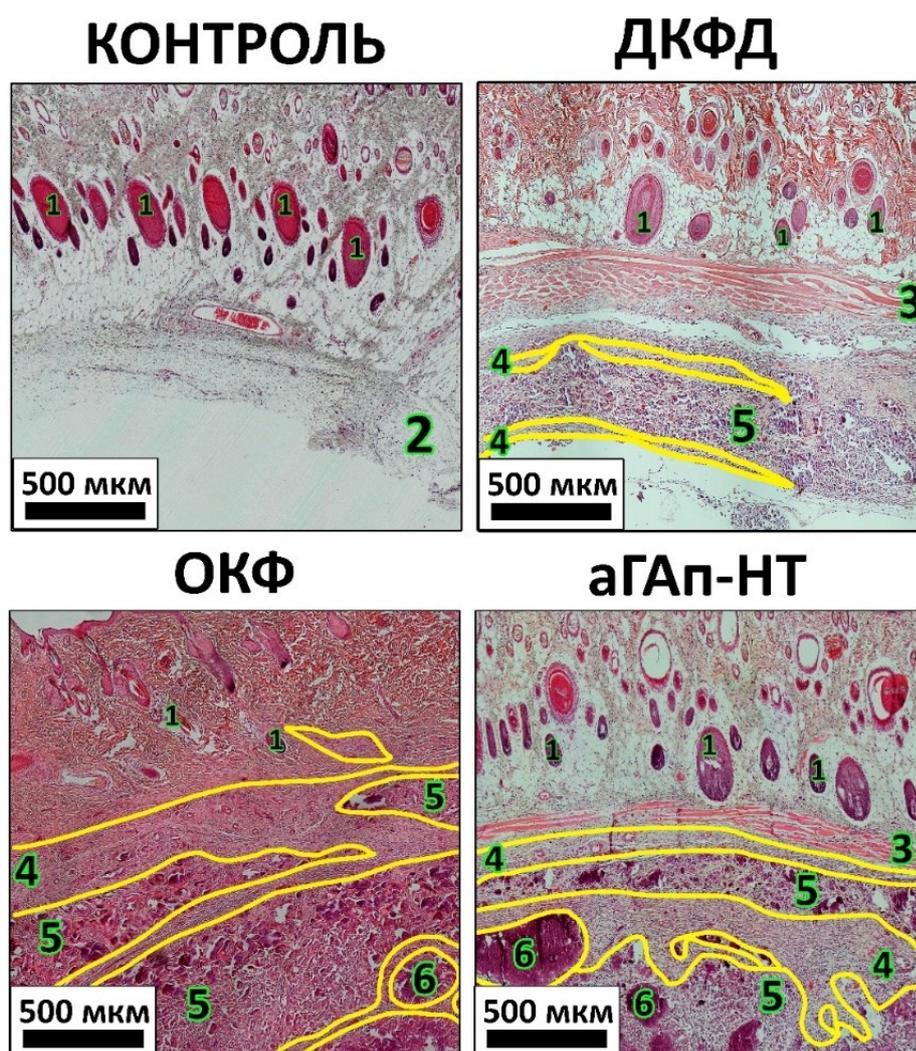


Рисунок 32 – Микрофотографии препаратов тканей перимплантного ложа и образцов материалов ДКФД, ОКФ и аГАп-НТ, полученных после 3 недель подкожной имплантации крысам. Окраска гематоксилин-эозином (ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты - в красный цвет, а мышечная ткань - в розовый цвет, агломераты КФС окрашены в цвет от розового до фиолетового). Желтой линией выделены зоны фиброзных капсул, образованных в месте контакта с материалом (области фиброзной трансформации капсул вокруг материалов). 1 – волосяные фолликулы; 2 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; 3 – мышечная ткань; 4 фиброзная ткань; 5 – грануляционная ткань; 6 – КФС.

В образцах аГАп-НТ была выявлена наиболее толстая, местами многослойная и практически не содержащая зрелых дефинитивных сосудов фиброзная капсула в зоне контакта с материалом, состоящая из зрелых слившихся коллагеновых волокон, свидетельствующая о наименьшей степени биосовместимости данного материала, содержащего к тому же в значительном количестве иммунные клетки в контактной зоне, что на данном сроке имплантации свидетельствует о проинфламаторном эффекте аГАп-НТ. Соотношение грануляционной/фиброзной тканей было в 2,5 раза меньше, чем для ОКФ, что свидетельствовало о фиброзно-рубцовой трансформации грануляционной ткани (Рис. 33). Сами образцы аГАп-НТ представляли собой плотные агрегаты частиц, покрытые слоями клеточного дебриса, сформировавшегося из мигрирующих и погибающих при контакте с материалом иммунных клеток. Всё это свидетельствует о наименее благоприятной реакции со стороны организма на аГАп-НТ среди всех исследованных *in vivo* КФС.

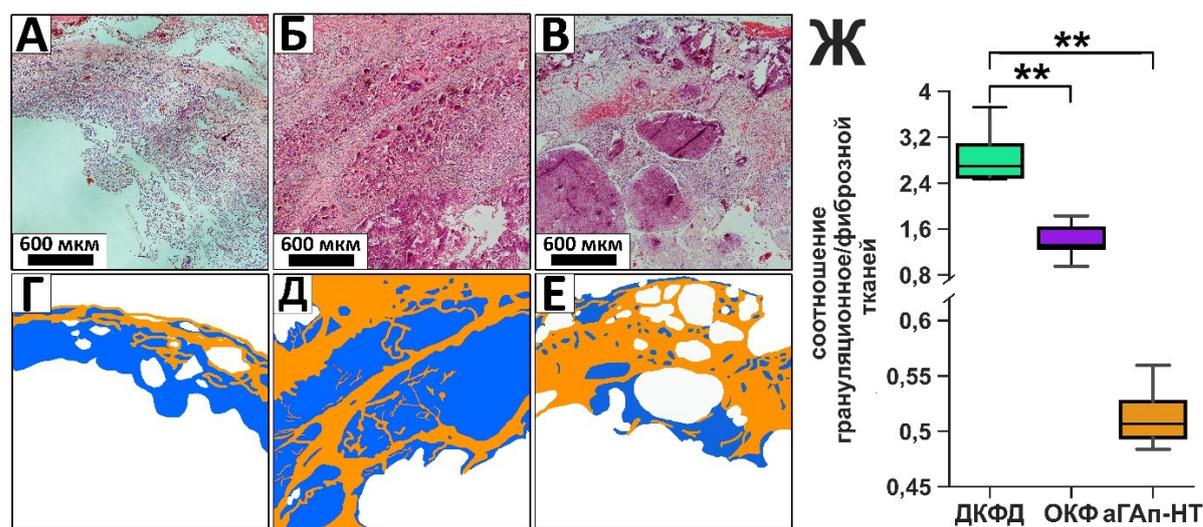


Рисунок 33. – Микрофотографии препаратов ДКФД (А), ОКФ (Б) и а-ГАп-НТ (В), капсул и тканей перимплантного ложа после 3 недель гетеротопической имплантации крысам. Окраска гематоксилин-эозином (ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты - в красный цвет, а мышечная ткань - в розовый цвет, агломераты КФС окрашены в цвет от розового до фиолетового). Г,Д,Е – Маски, наложенные на области грануляционной (синий цвет) и фиброзной (оранжевый цвет) тканей препаратов ДКФД (Г), ОКФ (Д) и а-ГАп-НТ (Е), полученные с использованием программного обеспечения ImageJ. Ж – График соотношения грануляционной/фиброзной ткани в образцах ОКФ и а-ГАп-НТ. Медиана ($n \geq 4$), интерквартильный размах, минимальное и максимальное значения ** – $p < 0,01$ относительно контроля (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), сравнение групп ОКФ и аГАп-НТ относительно ДКФД с использованием теста Даннетта).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что все исследованные материалы проявляли признаки безопасности и остеокондуктивности *in vivo*, при этом наибольшая степень совместимости с клетками и тканями реципиента среди исследованных КФС была выявлена для ДКФД, а наименьшая – для аГАп-НТ.

3.2.3 Исследование цитотоксических свойств и влияния на внутриклеточные процессы Sr-замещённого октакальций фосфата *in vitro*

В связи с нестабильностью ДКФД, трансформирующегося при хранении в безводный дикальций фосфат, а также выявленной сравнительно большей остеокондуктивностью высокостабильного ОКФ по сравнению с аГАп-НТ, в дальнейшей работе была оценена возможность увеличения биосовместимости ОКФ за счет подхода частичного катион-замещения. Поскольку цитотоксический эффект ОКФ может быть связан с локальным повышением $[Ca^{2+}]$, образующегося в ходе растворения ОКФ при взаимодействии с клетками, был предложен подход увеличения цитосовместимости ОКФ путём частичного замещения Ca^{2+} в его кристаллической структуре на ионы других металлов.

Одним из применяемых для повышения биосовместимости ОКФ подходов является замещение токсичных ионов Ca^{2+} на ионы других металлов. Известно, что нативный гидроксиапатит костной ткани содержит включения различных микроэлементов, выполняющих структурные и регуляторные функции в костной ткани [Gaffney-Stomberg, 2019]. Среди родственных Ca^{2+} ионов наибольшее внимание на сегодняшний день привлекает Sr^{2+} , что в первую очередь связано использованием ранелата стронция в качестве лекарства от остеопороза. Показано, что Sr^{2+} способен встраиваться в структуру костной матрикса и повышать его прочностные характеристики, а также активировать кальций-связывающий рецептор [Querido, Rossi, Farina, 2016]. Кроме того, также показаны остеоиндуктивные свойства Sr^{2+} , то есть способность стимулировать образование костной ткани остеобластами и снижать её резорбцию остеокластами [You, Zhang, Zhou, 2022]. Вследствие этого было принято решение произвести частичную замену ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} и исследовать цитотоксические свойства полученных материалов *in vitro*. Таким образом, в работе была оценена возможность уменьшения токсичности ОКФ с сохранением его остеоиндуктивных свойств путем частичных замены ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} . Идея такого подхода основана на применении ранелата стронция в качестве лекарства от остеопороза, на данных литературы об остеоиндуктивных свойствах Sr^{2+} [Borciani *u др.*, 2022].

С целью оценки влияния замещения ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} в кристаллической решетке ОКФ на его биосовместимость было исследовано влияние ОКФ и его Sr-замещённых

аналогов на жизнеспособность мезенхимальных мышечных клеток линии СЗН/10Т1/2. Оценка жизнеспособности мезенхимальных клеток СЗН/10Т1/2 после инкубации с ОКФ и ОКФ-Sr с различной степенью замещения Ca^{2+} на Sr^{2+} проводилась на модели добавления суспензии частиц на закрепленные клетки. Через 96 часов инкубации с клетками ОКФ без замещения в структуре Ca^{2+} на Sr^{2+} значительно снижал жизнеспособность клеток в диапазоне концентраций от 10 и вплоть до 0,1 мг/мл (Рис. 34). Цитотоксичность ОКФ с 1% заменой кальция стронцием (ОКФ-Sr_1) не отличалась от ОКФ без замещения. Количество живых клеток после инкубации с ОКФ с 5% и 10% заменой кальция стронция (ОКФ-Sr_5 и ОКФ-Sr_10 соответственно) была незначительно выше, чем после инкубации с нативным ОКФ. Однако количество живых клеток после инкубации со степенью замещения 20% и 50% (CaP-Sr_20 и CaP-Sr_50 соответственно) значительно возрастало по сравнению с материалом без замещения.

Таким образом, замена в структуре ОКФ 20% или более кальция стронцием позволяет значительно снизить его цитотоксичность. В исследовании Shi и соавторов (2017) также было показано, что увеличение содержания стронция в ОКФ, полученном высокотемпературным методом, значительно повышает жизнеспособность и пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток по сравнению с незамещенным ОКФ [Shi *и др.*, 2017b]. Авторы предположили, что такой эффект может быть связан с отсутствием воздействия стронций замещённого ОКФ на содержание кислых компартментов, а также с отсутствием или, возможно, ингибирующим воздействием на продукцию активных форм кислорода.

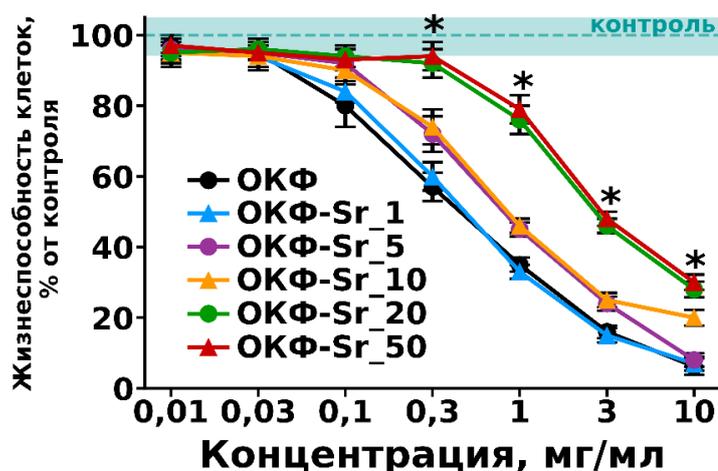


Рисунок 34 – Цитотоксический эффект ОКФ и ОКФ-Sr через 4 суток после их добавления (1 сутки после посева плотностью 15 тысяч клеток/см²) к распластанным клеткам СЗН/10/Т1/2. Среднее (n≥4) ± стандартное отклонение. * – p < 0,05 между ОКФ и ОКФ-Sr_50. (U-критерий Манна-Уитни).

В дальнейших экспериментах по изучению действия ОКФ и ОКФ-Sr на клетки СЗН/10Т1/2 для ОКФ-Sr_20 и ОКФ-Sr_50 использовали концентрацию 1 мг/мл, для которой наблюдалась максимальная разница в жизнеспособности клеток между ОКФ-Sr и ОКФ.

С целью дальнейшей оценки влияния ОКФ и Sr-ОКФ была произведено исследование содержания кислых компартментов, а также митохондриального потенциала и продукции активных форм кислорода (АФК). Известно, что изменение содержания кислых компартментов (таких как лизосомы) и митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), вызванные различными индуцирующими факторами, являются одними из ключевых событий клеточного повреждения [Domagala *u др.*, 2018; Pисса *u др.*, 2021]. Таким образом, в дальнейшем было проведено исследование содержания кислых компартментов и мембранного потенциала митохондрий в клетках СЗН/10Т1/2 после 96 ч совместной инкубации с ОКФ и ОКФ-Sr. Для оценки содержания кислых компартментов и $\Delta\Psi_m$ использовали красители LysoTracker Green и DIOC6(3), соответственно, с последующей проточной цитометрией [Gambles *u др.*, 2021; Tokuyama *u др.*, 2020]. При исследовании содержания кислых компартментов после совместной инкубации клеток с ОКФ и ОКФ-Sr в течение 96 часов показано, что инкубация с ОКФ достоверно повышала содержание кислых компартментов в клетках СЗН/10Т1/2 по сравнению с необработанным контролем ($p < 0,05$) (Рис. 35А).

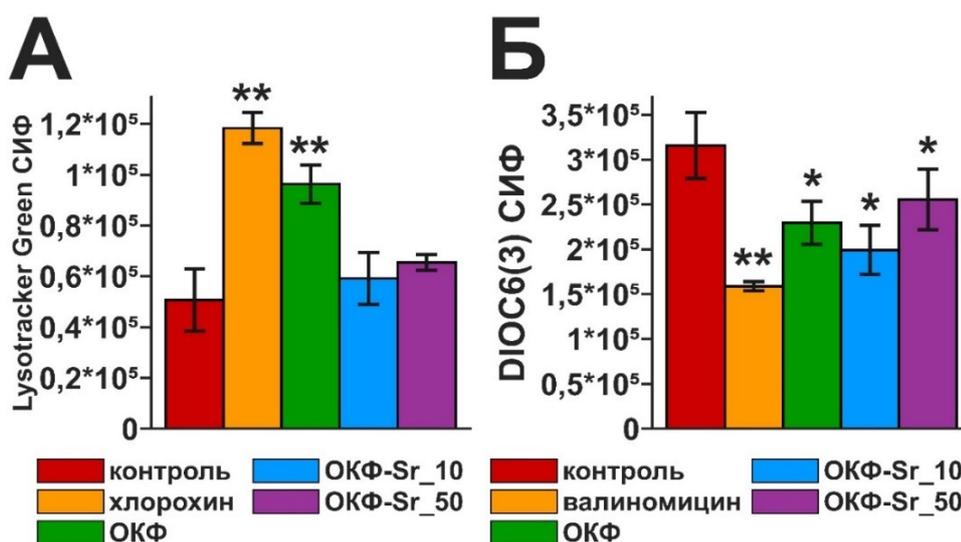


Рисунок 35 – Влияние ОКФ и Sr-ОКФ на содержание кислотных компартментов (А) и потенциал митохондриальной мембраны (Б) после 96ч культивирования с мезенхимальными клетками линии СЗН/10/Т1/2. СИФ – средняя интенсивность флуоресценции. * – $p < 0,05$ относительно контроля; ** – $p < 0,01$ относительно контроля (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), сравнение экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Даннетта)

С другой стороны, инкубация клеток со всеми ОКФ-Sr в течение 96 ч не приводила к увеличению содержания кислых компартментов в клетках по сравнению с контролем.

При изучении влияния ОКФ и ОКФ-Sr на потенциал митохондриальной мембраны в клетках СЗН/10Т1/2 было показано, что инкубация клеток как с ОКФ, так и со всеми различными ОКФ-Sr, независимо от степени замещения Ca^{2+} на Sr^{2+} , не приводило к достоверному снижению $\Delta\Psi_m$ в клетках, через 96 ч совместной инкубации (Рис. 35Б).

Для подтверждения результатов проточной цитометрии, содержание кислых компартментов и мембранный потенциал митохондрий в клетках СЗН/10Т1/2 были исследованы с использованием конфокальной микроскопии. Для этого клетки после 96 часов соинкубации с ОКФ и ОКФ-Sr окрашивались флуоресцентными красителями LysoTracker Green и MitoTracker Red CMXRos [Gambini *u др.*, 2020]. Для визуализации клеточных ядер также использовался краситель Hoechst 33342. Результаты конфокальной микроскопии, также как и данные проточной цитометрии, показали увеличение содержания кислых компартментов и снижение потенциала митохондриальной мембраны (Рис. 36).

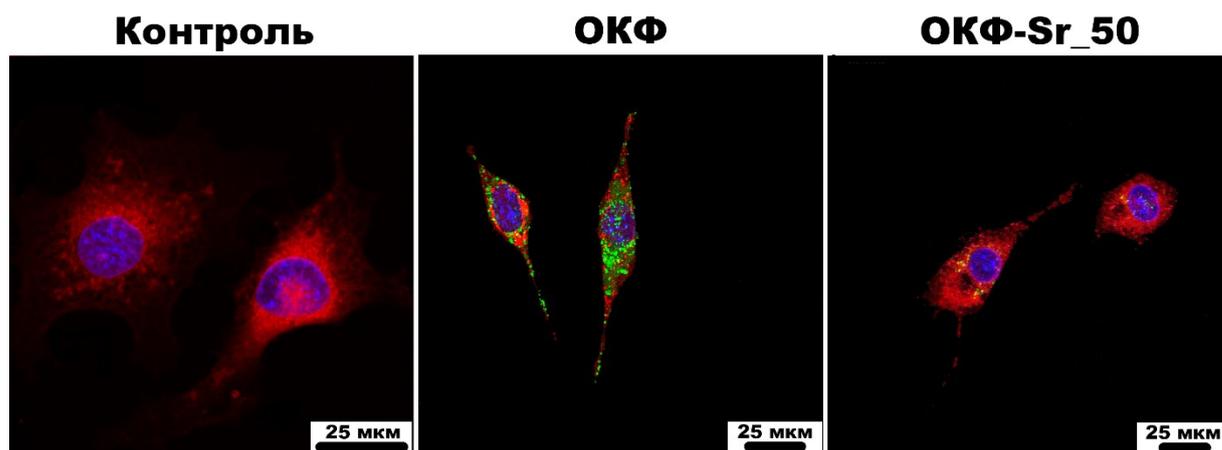


Рисунок 36 – Микрофотографии мезенхимальных клеток линии СЗН/10Т1/2 через 96 часов культивирования с ОКФ и ОКФ-Sr_50. Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синий), кислые компартменты окрашены LysoTracker Green DND-26 (зеленый) и митохондрии окрашены MitoTracker Red CMXRos (красный). Конфокальная микроскопия.

Известно, что активные формы кислорода (АФК) имеют важное значение как в регуляции нормальных клеточных процессов, так и при различных патологических состояниях [Zarkovic, 2020]. Помимо это митохондрии играют важную роль, как в остеогенной дифференцировке МСК, так и в АФК-опосредованном остеокластогенезе [Dobson *u др.*, 2020; Riegger *u др.*, 2023]. В связи с этим представляло дальнейший интерес исследование изменении продукции АФК под влиянием ОКФ и ОКФ-Sr.

После совместной инкубации клеток с ОКФ и Sr-ОКФ в течение 96 ч не наблюдалось достоверное изменение в продукции АФК. Однако для ОКФ с максимальным замещением

стронцием теоретических 50 ат. % (ОКФ-Sr_50) показано трёхкратное снижение продукции АФК по сравнению с контролем (Рис. 37). Из литературных данных известно, что Sr^{2+} может проявлять антиоксидантные свойства. Так, в исследовании Zhou и соавторов (2019), было показано, что использование Sr-замещенных ОКФ может снижать продукцию АФК в мезенхимальных стволовых клетках [Zhou *и др.*, 2019].

Предполагается, что механизмы антиоксидантного действия стронций замещенных КФС, вероятно, связаны с увеличением активности ключевых антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза [Jebahi *и др.*, 2013]. Также ионы Sr^{2+} способны ингибировать перекисное окисление липидов, что способствует уменьшению повреждений клеток вследствие окислительного стресса [Yalin *и др.*, 2012]. АФК играют важную роль в дифференцировке остеокластов, ответственных за резорбцию кости [Agidigbi, Kim, 2019]. В то же время, стронций, ингибирует образование остеокластов и способствует дифференцировке остеобластов [Marx *и др.*, 2020]. Следовательно, можно предположить, что антиоксидантные свойства Sr^{2+} могут оказывать влияние на его способности ингибировать остеокластогенез.

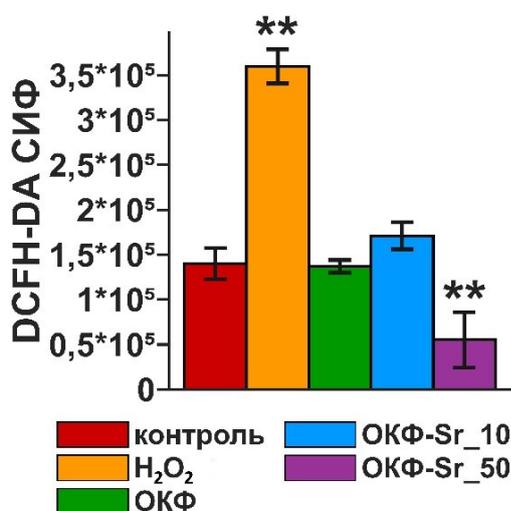


Рисунок 37 – Влияние ОКФ и ОКФ-Sr на внутриклеточную продукцию активных форм кислорода в мезенхимальных клетках линии C3H/10/T1/2 через 96 часов культивирования. СИФ – средняя интенсивность флуоресценции. ** – $p < 0,01$ относительно контроля (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), сравнение экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Даннетта).

Результаты исследований *in vitro* показывают, что замена Ca^{2+} на Sr^{2+} , от 20% замещения и выше, в составе ОКФ позволяет значительно снизить цитотоксичность ОКФ. Дополнительно, можно отметить, что ОКФ-Sr не вызывал увеличения содержания кислых органелл в клетках, в отличие от ОКФ. Влияние ОКФ и ОКФ-Sr на внутриклеточную продукцию АФК показывает, что ОКФ, как и большинство исследованных вариантов ОКФ-

Sr не изменяют конститутивную продукцию АФК, в то время как ОКФ-Sr_50% значительно снижал продукцию АФК клетками СЗН/10Т1/2.

Исходя из полученных данных можно предположить, что цитотоксический эффект ОКФ может быть в первую очередь связан с увеличением содержания кислотных компартментов. Известно, что цитотоксическое действие фосфатов кальция может быть связано с быстрым растворением этих соединений в лизосомах с последующим их разрывом и некрозом клеток [Chen *и др.*, 2014a]. Можно было бы предположить, что стронций-содержащие кальцийфосфатные соединения могут медленнее разлагаться в фаголизосомах клеток, чем кальций-фосфатные соединения без стронция, и поэтому не вызывают повреждения и биогенеза лизосомальных кислых компартментов в клетках. Тем не менее, замещение ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} не приводит к заметным изменениям в скорости растворения кальций-фосфатного материала при снижении уровня pH. Кроме того, следует отметить, что как ионы кальция, так и стронция оказывают одинаковое воздействие на осмотическое давление. Кроме того, не специализирующиеся на фагоцитозе крупных частиц СЗН/10Т1/2, не способны фагоцитировать микроразмерные кристаллы ОКФ. Принимая во внимание ранее полученные данные по неспецифической адгезии частиц ОКФ к клеточной поверхности, более вероятным является внеклеточный механизм цитотоксичности ОКФ. Известно, что стронций и кальций обладают сходными химическими и биологическими свойствами, и оба незаменимы для человека [Habibovic, Barralet, 2011]. Благодаря своему сходству Ca^{2+} и Sr^{2+} являются регуляторами и агонистами Ca-чувствительных рецепторов, играющих важную роль в дифференцировке стромальных клеток костного мозга [Cianferotti *и др.*, 2015]. При этом Ca^{2+} также действует как конкурентный ингибитор притока Sr^{2+} , а Sr^{2+} ингибирует поглощение Ca^{2+} путем подавления пути оттока, модулируемого митохондриальным мембранным потенциалом ($\Delta\Psi$) [Yuan *и др.*, 2017]. Возможно, подобное конкурентное взаимодействие между Ca^{2+} и Sr^{2+} может приводить к уменьшению притока ионов Ca^{2+} внутрь клетки и, таким образом, снижать его цитотоксическое действие.

Таким образом, представленные *in vitro* данные указывают на то, замена Ca^{2+} на Sr^{2+} в составе ОКФ-Sr_50 оказывает цитопротекторное действие за счет подавления окислительной активности в клетках и, возможно, стабилизации процессов аутолиза.

3.2.4 Исследование биосовместимости и цитотоксических свойств Sr-замещённого октакальций фосфата *in vivo*

В дальнейшем был выполнен сравнительный анализ степени биосовместимости ОКФ-Sr₅₀ и ОКФ после подкожной имплантации крысам стока Wistar также на срок 3 недели (Рис. 38).

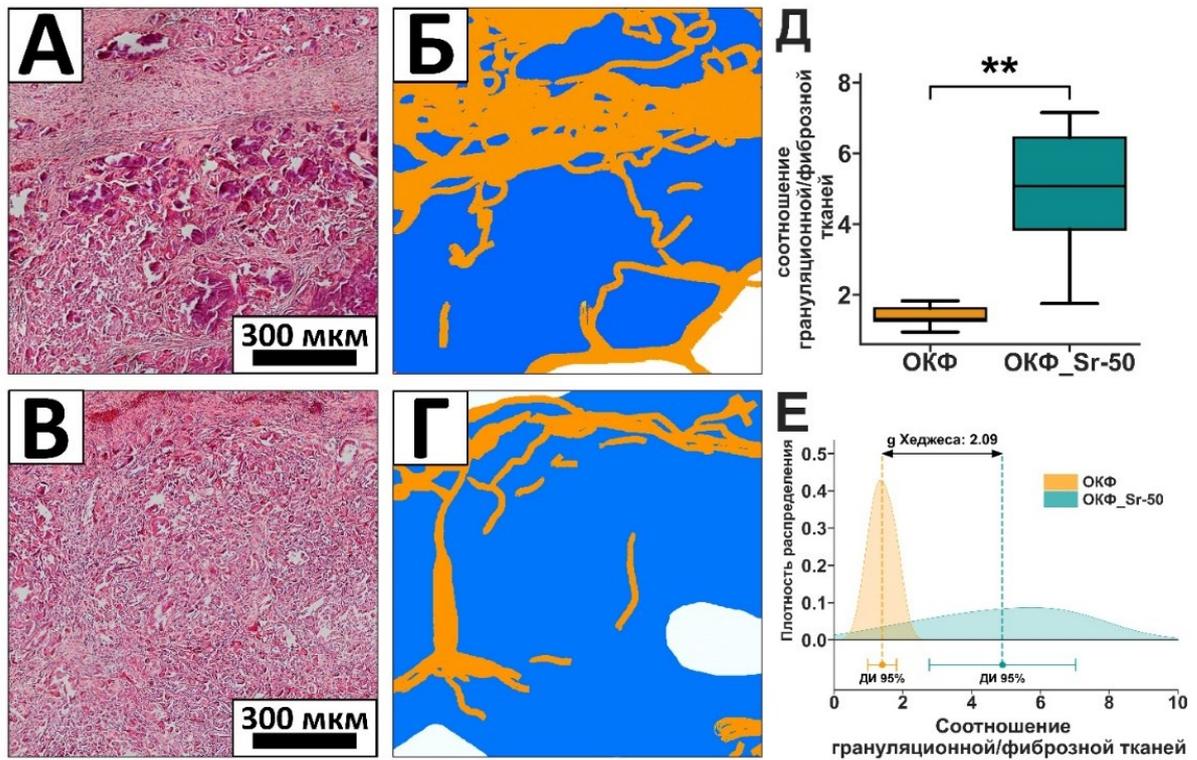


Рисунок 38 – Микрофотографии препаратов ОКФ (А) и ОКФ-Sr₅₀ (В), капсул и тканей перимплантного ложа после 3 недель гетеротопической имплантации крысам. Окраска гематоксилин-эозином (ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты - в красный цвет, а мышечная ткань - в розовый цвет, агломераты КФС окрашены в цвет от розового до фиолетового). Б, Г – Маски, наложенные на области грануляционной (синий цвет) и фиброзной (оранжевый цвет) тканей препаратов ОКФ (Б) и ОКФ-Sr₅₀ (Г), полученные с использованием программного обеспечения ImageJ. Д – График соотношения грануляционной/фиброзной ткани в образцах ОКФ и ОКФ_Sr-50. Медиана ($n \geq 4$), интерквартильный размах, минимальное и максимальное значения ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни). Е – размер наблюдаемого эффекта разницы в соотношении грануляционной/фиброзной тканей между образцами ОКФ и ОКФ_Sr-50, выраженная как стандартизированная разница средних (коэффициент g Хэджеса). Коэффициент Хэджеса $> 0,8$ свидетельствует о большом наблюдаемом эффекте. Среднее ($n \geq 4$) \pm доверительный интервал (ДИ).

Для образцов ОКФ наблюдалось формирование выраженной многоуровневой (прорастающей внутрь) реактивно-измененной фиброзной ткани, содержащей как фибробласты, так и реактивные иммунные клетки гистио-лимфоцитарного звена (Рис. 38). Капсула вокруг ОКФ-образцов была значительно толще и плотнее, чем вокруг ОКФ-Sr, а также содержала небольшое количество зрелых мелких кровеносных сосудов, что

указывает на фиброзно-рубцовый характер трансформации грануляционной ткани. При этом сами образцы ОКФ, в отличие от ОКФ-Sr, представляли собой агрегировавшие в плотный слой и практически бесклеточные агломераты с четкой каймой вокруг данных агломератов гистио-лимфоцитарных клеток.

Для образцов ОКФ-Sr отмечалась значительно более выраженная и развитая грануляционная ткань с меньшей по площади фиброзной неколлагеновой капсулой вокруг образцов без признаков слияния волокон и гибели клеток в ней, содержащей к тому же большое количество мелких и дефинитивных кровеносных сосудов, что свидетельствовало о физиологических процессах репаративного гистогенеза в месте имплантации и отсутствии фиброзно-рубцовой трансформации в образцах и тканях реципиентного ложа. Стоит также отметить, что образцы ОКФ-Sr значительно быстрее подвергались резорбции, чем образцы ОКФ, то есть были нетоксичными для клеток реципиента и способными к биодegradации. При этом резорбция материалов не сопровождалась фиброзным замещением, о чём свидетельствует соотношение грануляционной/фиброзной тканей, которое для образцов ОКФ-Sr было в 6 раз больше, по сравнению с ОКФ (Рис. 38Д, Е). Всё это свидетельствовало о выраженном повышении признаков биологической безопасности и остеокондуктивности ОКФ при его допировании ионами Sr^{2+} .

3.3 Повышение остеогенного потенциала дикальций фосфат дигидрата в композиции с деминерализованным костным матриксом

На основании всех полученных выше результатов необходимо отметить, что все исследованные КФС не обладали признаками остеоиндуктивного или остеогенного потенциала. В связи с этим в дальнейшем оценивали возможность повышения остеогенных свойств ДКФД в композиции с ДКМ (ДКМ/ДКФД). Благодаря схожести подобного композита по структуре и составу с костной тканью он гипотетически должен проявлять остеогенные свойства.

Деминерализованный костный матрикс был получен по технологии (см. пункт 2.1.3) из бедренной кости крупного рогатого скота, подвергшейся многостадийной обработке, включающей децеллюляризацию, делипидизацию и щадящую деминерализацию. В результате обработки ксеногенного костного матрикса, включавшей в себя процедуры децеллюляризации, делипидизации и деминерализации костной ткани, было обнаружено, что содержание кальция в образцах после обработки составляло $0,78 \pm 0,34$ мкг/мг сухой массы ткани (Рис. 39А). При этом содержание донорской клеточной ДНК составляло

2,18±0,97 нг/мг массы ткани (Рис. 39Б). Эти результаты указывают на высокую степень очистки ксеногенного костного коллагена.

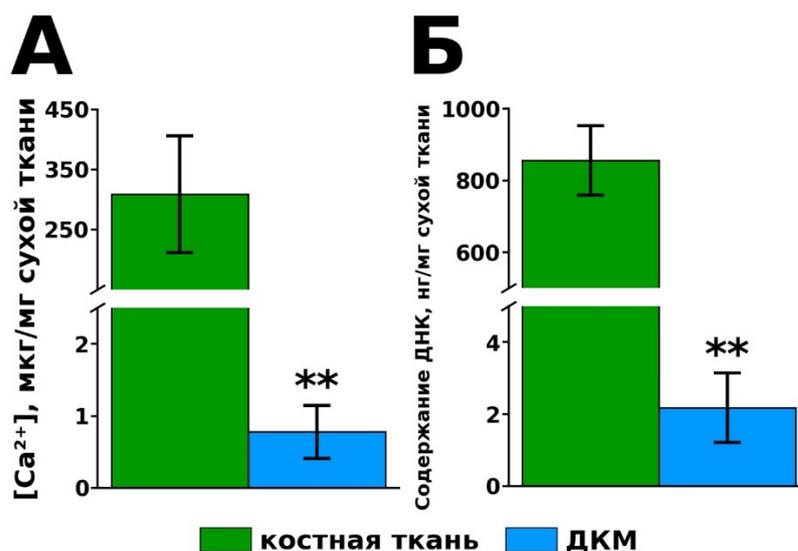


Рисунок 39 – Результаты оценки эффективности очистки ДКМ после процедур деминерализации и децеллюляризации. А – содержание Ca²⁺ в образцах до и после деминерализации, ** – p<0,01 относительно контроля (U-критерий Манна-Уитни); Б – содержание остаточной клеточной ДНК в ДКМ до и после децеллюляризации, ** – p<0,01 относительно костной ткани (U-критерий Манна-Уитни).

Данные микроКТ (Рис. 40А) и СЭМ (Рис. 40Б, В) образцов ДКМ показали, что фибриллярная структура трабекулярного матрикса ДКМ полностью сохранялась, без признаков расслоения и расслоения фибрилл, а также нарушения целостности ламелл с потерей трехмерной структуры. Таким образом, архитектура внеклеточного коллагенового матрикса ДКМ полностью соответствовала нативному коллагеновому внеклеточному матриксу.

Дифференциально-гистохимический анализ ДКМ также показал полное отсутствие донорских клеток/остаточного клеточного дебриса в матрице (Рис. 40Г) и отсутствие каких-либо соединений кальция в матрице, в том числе внутри костных трабекул (Рис. 40Е). Данный анализ также подтвердил сохранение макромолекулярной структуры коллагена костной трабекулы во всех образцах без каких-либо признаков изменения средства окрашивания коллагена (Рис. 40Д).

Цитотоксические свойства трехмерной матрицы ДКМ, а также адгезию клеток к его поверхности определяли методом конфокальной микроскопии с последующей цифровой обработкой изображений.

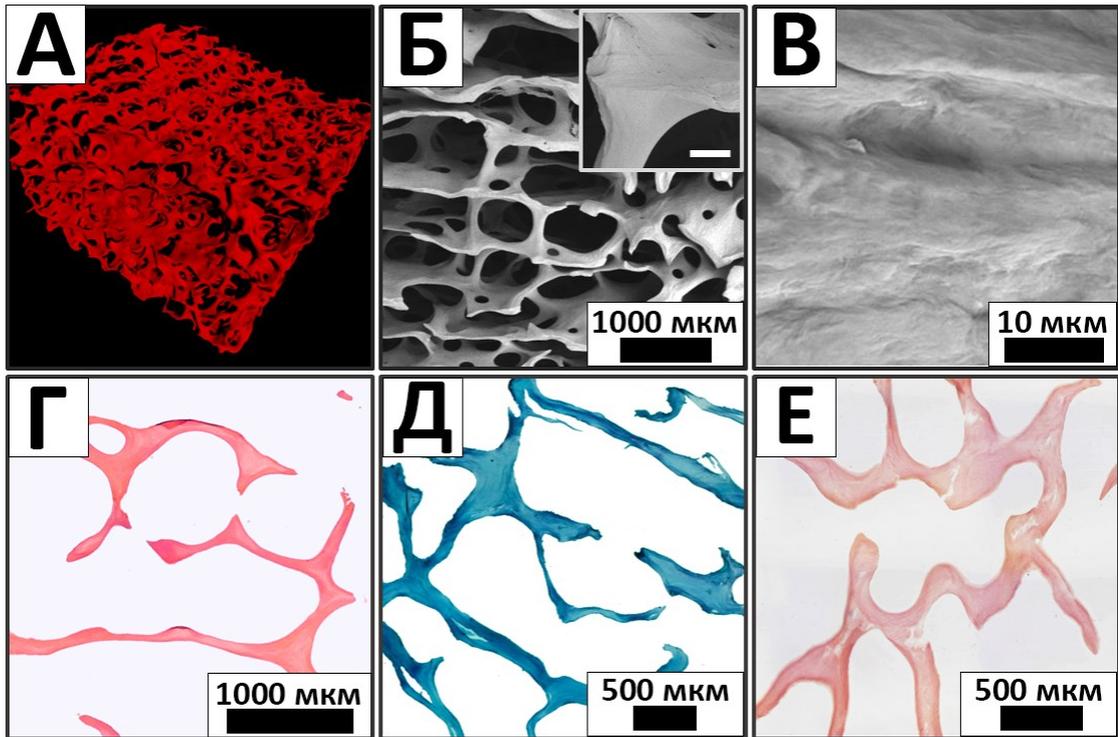


Рисунок 40 – Результаты морфологического анализа ДКМ до реминерализации: **А** – микроКТ-изображение ДКМ; **Б** — общий вид трехмерной матрицы, внутренние вставки: увеличенный фрагмент костной трабекулы, масштаб 100 мкм. Сканирующая электронная микроскопия; **В** — увеличенный фрагмент коллагеновой трабекулярной поверхности. Сканирующая электронная микроскопия; **Г** – Микрофотография среза ДКМ, окраска гематоксилином и эозином (отсутствие ядер клеток (окрашены синим), эритроцитов (окрашены красным) и мышечной ткани (окрашены розовым)); **Д** – Микрофотография среза ДКМ, трихромное окрашивание Лилли (коллаген окрашен в синий цвет, отсутствие мышц и других тканей окрашены в красный цвет, а ядра клеток окрашены в коричневый цвет); **Е** – Микрофотография среза ДКМ, окраска ализариновым красным S и толуидиновым синим (метод МакГи-Рассела в модификации Даля). Отложения кальция на срезах не обнаруживаются)

На рисунке 41 представлена микрофотография клеток MG-63, культивируемых на покровном стекле (контроль) и на образцах ДКМ, через 24ч и 72 ч после посева. Было обнаружено, что количество мертвых клеток составляет $6,3 \pm 3,7\%$ в контрольных условиях через 24 часа. Через 24 часа после посева клеток на ДКМ все клетки были прикреплены к поверхности ДКМ, а количество мертвых клеток составило $8,4 \pm 7,1\%$, что не отличалось достоверно от контрольных условий.

Через 72 часа культивирования в контрольных условиях клетки достигли конfluence, а количество погибших клеток составило $10,4 \pm 1,5\%$. Анализ образцов ДКМ через 72 ч показал достижение клетками конfluence на поверхности матрицы, что свидетельствовало о наличии пролиферативной активности клеток на матрице. При этом количество погибших клеток составило $11,7 \pm 4,1\%$, что также не отличалось от

контрольных условий. Все вышеизложенное свидетельствует об отсутствии цитотоксического действия ДКМ, а также о необходимом остеокондуктивных свойствах.

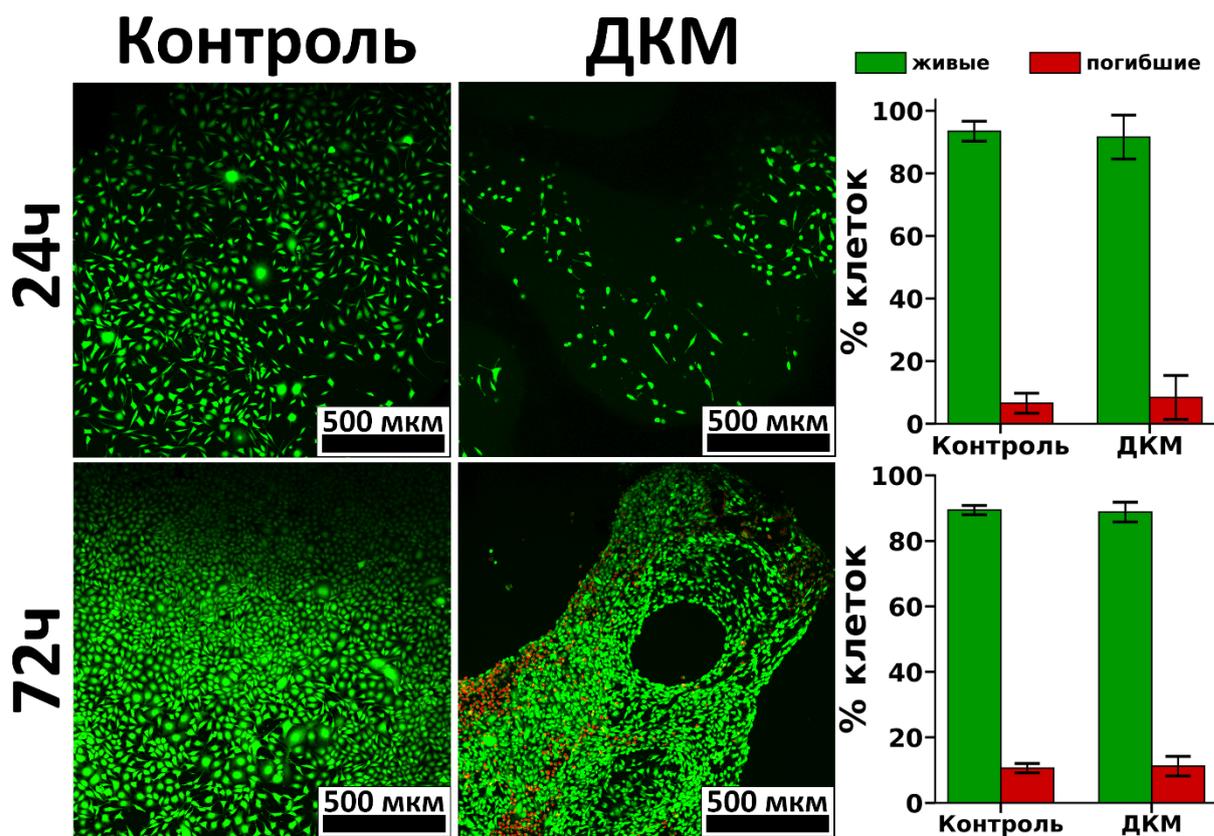


Рисунок 41 – Цитотоксичность ДКМ через 24 и 72 часа культивирования на нем клеток линии MG-63. Контроль – клетки СЗН/10Т1/2, культивировавшиеся на пластике. Конфокальная микроскопия. Окраска и кальцеин АМ и йодид пропидия. Цитоплазма живых клеток окрашена в зелёный цвет, ядра мертвых клеток – в красный цвет

Осаждение ДКФД на поверхность ДКМ проводили по указанной ранее методике (см. пункт 2.1.4). Результаты сканирующей электронной микроскопии показали, что частицы порошка представляли собой пластинчатые кристаллы длиной от 20 до 100 мкм. (Рис. 42Б, Д). ДКФД характеризуется пластинчатой морфологией частиц с шириной пластин от 10 до 35 мкм и толщиной до нескольких микрон в зависимости от размера частиц.

СЭМ реминерализованных образцов ДКМ выявила равномерное распределение осадка на поверхности коллагеновых трабекул ДКМ, образывавшего округлые полусферические образования типа «цветок розы», характерные для ДКФД (Рис. 42В, Е). Осаждение из растворов на полимерной матрице ДКМ приводило к уменьшению размера частиц ДКФД, что может быть связано с гетерогенной нуклеацией на коллагеновых трабекулах [Kumar *и др.*, 2008].

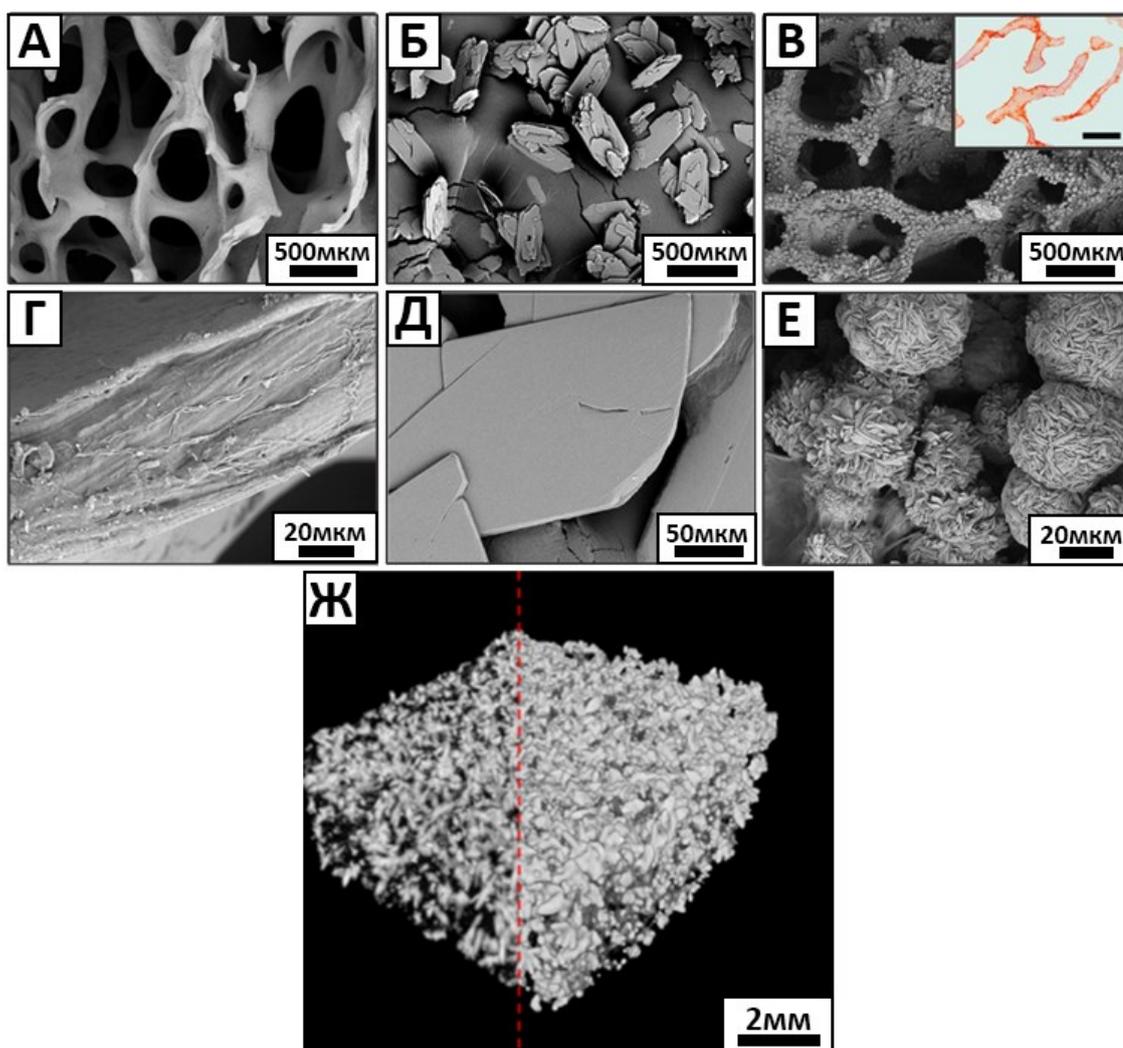


Рисунок 42 – Результаты морфологического анализа образцов ДКФД и remineralизованных ДКМ/ДКФД; А, Г – СЭМ поверхности ДКМ до remineralизации ДКФД; Б, Д – СЭМ ДКФД; В, Е – СЭМ remineralизованного ДКМ/ДКФД, внутренние вставки: поперечное сечение remineralизованного ДКМ, окраска ализариновым красным S (метод МакГи-Рассела, отложения кальция окрашены в оранжево-красный цвет, шкала 500 м); Ж – трехмерная структура покрытия ДКФД на ДКМ при 2 М отведениях CaCl_2 , полученная с использованием микроКТ

Гистологический анализ remineralизованной до имплантации ДКМ показал полное осаждение отложений кальция непосредственно на трабекулярной поверхности, без их проникновения в основную толщу коллагенового матрикса, т. е. отсутствие межтрабекулярной минерализации и поверхностное осаждение отложений кальция (Рис. 42В, вставка).

Для образцов ДКМ без ДКФД-покрытия через 7 недель после имплантации была выявлена высокая степень биосовместимости на фоне полного отсутствия остеоиндуктивного и остеогенного потенциала. Через семь недель после имплантации чистые образцы ДКФД показали полную резорбцию имплантированных материалов без

каких-либо признаков инкапсуляции, асептического кальциноза здоровых тканей, фиброза или образования локальных спаек в периимплантном ложе, т.е. имплантация оставалась неизменной от окружающих здоровых тканей крыс-реципиентов как на макро-, так и на микроскопическом уровне. В связи с отсутствием как положительных, так и отрицательных эффектов результаты гистологического анализа не представлены. Полученные данные свидетельствовали о выраженной биосовместимости и достаточно быстрой скорости резорбции низкотемпературного ДКФД у экспериментальных животных, выражающейся в полном восстановлении тканей имплантируемого ложа в течение семи недель после имплантации материалов.

Для образцов ДКМ без ДКФД-покрытия через 7 недель имплантации была выявлена высокая биосовместимость, однако и полное отсутствие остеоиндуктивного и остеогенного потенциала (Рис. 43).

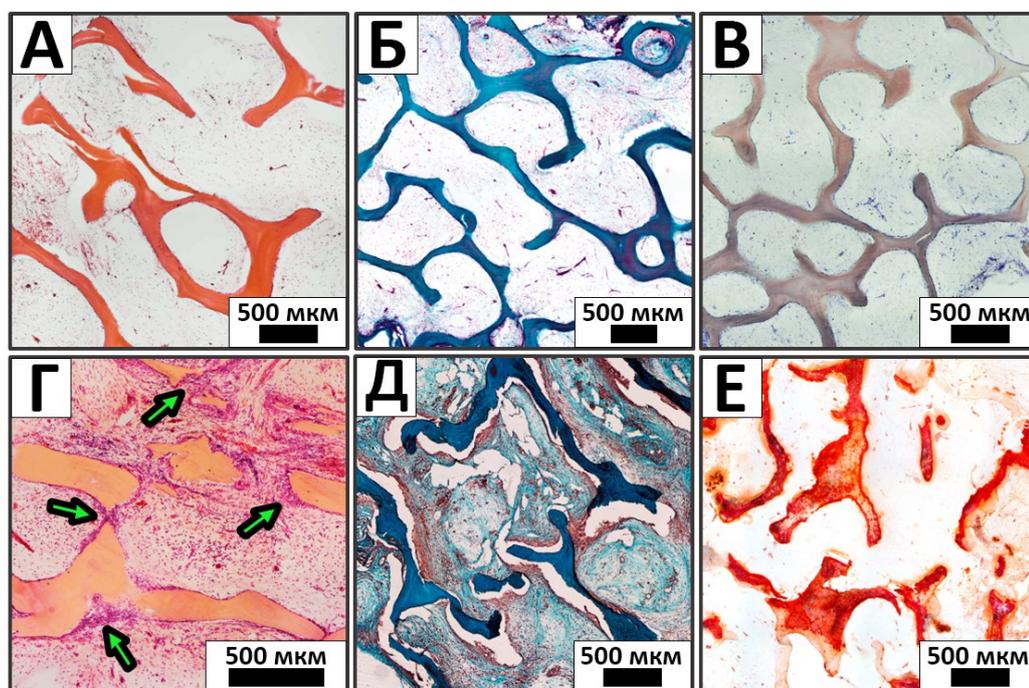


Рисунок 43 – Гистологический анализ образцов ДКМ и ДКМ/ДКФД через 7 недель подкожной имплантации. А – Микрофотографии криорезов ДКМ без реминерализации; Б – Микрофотографии криорезов ДКМ без реминерализации; В – Микрофотографии криорезов ДКМ без реминерализации; Г – Микрофотографии криорезов ДКМ/ДКФД; Д – Микрофотографии криорезов ДКМ/ДКФД; Е – Микрофотографии криорезов ДКМ/ДКФД. А,Г – окраска Н&Е (ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты - в красный цвет, а мышечная ткань - в розовый цвет); Б,Д – трихромная окраска по Лилли (коллаген окрашен в синий цвет, мышцы и другие ткани - в красный цвет, ядра клеток - в коричнево-красный цвет); В,Е – окрашивание ализариновым красным S и толуидиновым синим (метод МакГи-Рассела в модификации Даля). Отложения кальция красного цвета на срезах не обнаруживаются (В) или отложения кальция окрашены в красный цвет (Е)

Сохранение ультраструктуры коллагенового матрикса после децеллюляризации и деминерализации костной ткани проявлялось отсутствием как ферментативной, так и клеточно-опосредованной резорбции имплантированного ДКМ. Высокая биосовместимость ДКМ проявлялась полным отсутствием признаков лейкоцитарной инвазии в имплантируемый материал, отсутствием гигантских клеток инородных тел и дегранулированных тучных клеток на периферии образцов, крайне слабым прорастанием реактивно-измененной соединительной ткани. внутри образца из ткани ложа имплантата и полная инволюция фиброзной капсулы к исследуемому периоду (Рис. 43А, Б). Также не было отмечено признаков минерализации ДКМ, как физиологической (межтрабекулярной) биоминерализации, так и патологического (утилизация) кальциноза (Рис. 43В). Признаки неоколлагенеза были выражены крайне слабо и наблюдались только на периферии образца и были инициированы процессами ремоделирования периимплантного ложа (влияние ткани хозяина), а не самой ДКМ.

Таким образом, установлено, что как низкотемпературный ДКФД, так и очищенный трехмерный коллагеновый ДКМ сами по себе не обладают остеоиндуктивным или остеогенным потенциалом и могут действовать максимум как остеокондуктор, не препятствуя прикреплению, миграции и пролиферации клеток реципиента.

В отличие от групп ДКМ и ДКФД по отдельности, для реминерализованного ДКМ были получены совершенно противоположные результаты. В реминерализованных образцах выявлены выраженные процессы гаптотаксиса, стимуляции пролиферации и синтетической активности клеток внутри имплантированных материалов (Рис. 43Г), сопровождающиеся выраженными процессами ремоделирования ДКМ (Рис. 43Г, стрелки), а также структурированный *de novo* неоколлагенез с построением новых трабекулоподобных структур между костной трабекулой и пластинками исходной ДКМ (Рис. 43Г, Д), что указывает на выраженную синтетическую активность остеобластов, дифференцированных в матриксе. Среди мигрировавших клеток не наблюдалось гистио-лимфоцитарных клеток, тучных клеток или гигантских клеток инородного тела; все клетки, наблюдаемые в матриксе, принадлежали к мезенхимальным клеткам. В то же время дифференцировки адипоцитарных клеток не наблюдалось.

Для реминерализованных материалов наблюдалось достоверное повышение степени минерализации матрикса ДКМ, при этом характер биоминерализации был чисто физиологическим (внутритрабекулярным), с активной инвазией отложений кальция в толщу трабекулы и без признаков деструкции и дефрагментации минерализованного

матрикса остеокластоподобными клетками; таким образом, признаков утилизионного кальциноза не наблюдалось (Рис. 43Е).

Исследование образцов методом адсорбционной спектроскопии показала увеличение содержания Ca^{2+} в образцах ДКМ/ДКФД более чем в 2 раза через 7 недель имплантации. Так до имплантации уровень Ca^{2+} в образцах составлял $28,71 \pm 2,66$ мкг/мг сухой ткани и поднимался до уровня больше 80 мкг/мг сухой ткани через 7 недель (Рис. 44А, Б).

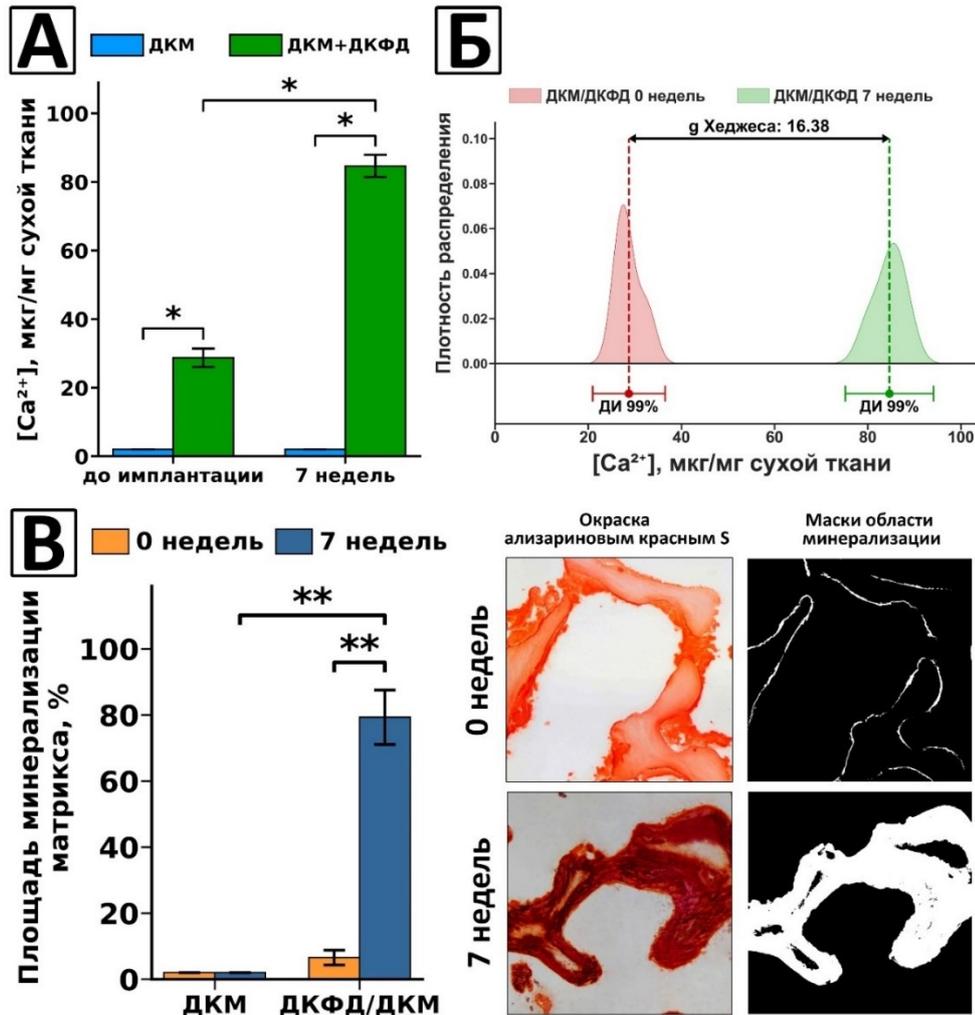


Рисунок 44 – Содержание Ca^{2+} в образцах ДКМ и ДКМ/ДКФД до и после 7 недель имплантации (**А**). * – $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни); Размер наблюдаемого эффекта разницы содержания Ca^{2+} в образцах группы ДКМ/ДКФД до и после 7 недель имплантации, выраженная как стандартизованная разница средних (коэффициент g Хеджеса) (**Б**). Коэффициент Хеджеса $> 0,8$ свидетельствует о большом наблюдаемом эффекте. Среднее ($n \geq 4$) \pm доверительный интервал (ДИ); **В** – результаты измерения площади внутритрабекулярной минерализации в образцах ДКМ и ДКМ/ДКФД, посчитанные по маскам микрофотографий срезов, полученных с использованием программного обеспечения ImageJ. Среднее ($n \geq 4$) \pm стандартное отклонение. * – $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни); ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни)

Анализ полученных гистологических изображений показал, что степень минерализации внутритрабекулярной ДКМ увеличилась более чем в 3 раза (Рис. 44В).

Помимо вышеперечисленного, новообразованный коллагеновый матрикс содержал новообразованные дефинитивные кровеносные сосуды, что также свидетельствует о том, что незрелые остеобласты, дифференцированные на матриксе, продуцируют не только компоненты костного матрикса, но и факторы ангиогенеза.

На рисунке 45 при большем увеличении видно, что строительство новых трабекул осуществляется непосредственно клетками-реципиентами (Рис. 45А,Б, стрелки), при этом внутрифибриллярная биоминерализация осуществляется центростремительно (снаружи вглубь трабекул).

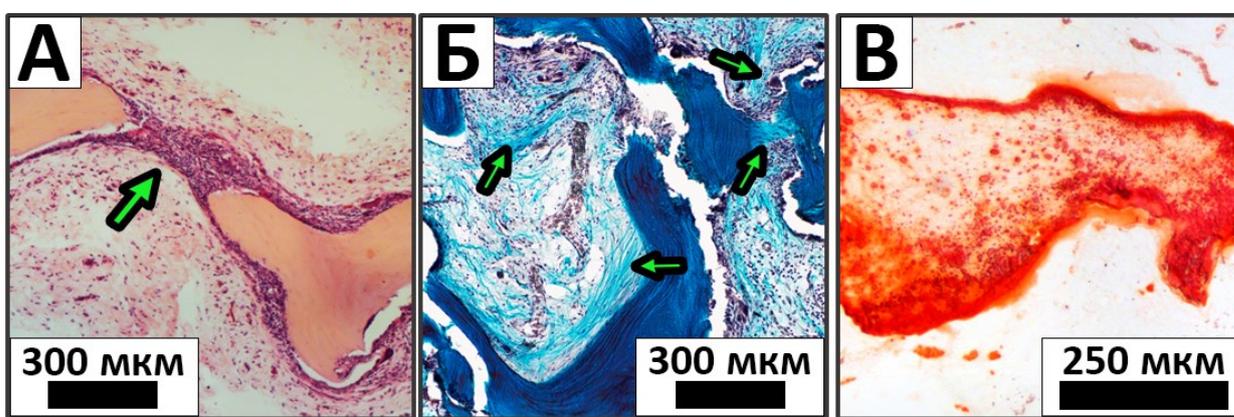


Рисунок 45 – Гистологический анализ имплантированных образцов ДКМ/ДКФД после 7 недель имплантации. **А** – окраска гематоксилином и эозином (ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты окрашены в красный цвет, а мышечная ткань окрашена в розовый цвет). Стрелками указаны новообразованные трабекулоподобные структуры; **Б** – трихромная окраска по Лилли (коллаген окрашен в синий цвет, мышцы и другие ткани окрашены в красный цвет, ядра клеток окрашены в коричневый цвет), новообразованные трабекулоподобные структуры указана стрелками; **В** — окраска ализариновым красным S (отложения кальция окрашены в оранжево-красный цвет).

Таким образом, использование природного ДКМ с сохранённой ультраструктурой в сочетании с осажёнными на его поверхности биоактивными предшественниками костного гидроксиапатита, позволяет создавать материалы с остеогенным эффектом и открывает новые перспективы для разработки и применения остеопластических материалов с высоким регенеративным потенциалом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что использование низкотемпературного синтеза кальций-фосфатных материалов позволяет в значительной степени повысить их биологическую безопасность и остеокондуктивность.

Пастообразные гидратированные ГАп-материалы неадгезивны для клеток *in vitro* и не проявляют остеоиндуктивных свойств *in vivo*. При этом в модели гетеротопической имплантации *in vivo* полученная высокотемпературным синтезом кальций-фосфатная паста вызывала асептическое воспаление и отторжение организмом реципиента, в то время как низкотемпературная низкокристаллическая кальций-фосфатная паста обладала всеми необходимыми признаками биобезопасности и остеокондукции. Полученные данные указывают на то, что биосовместимость пастообразных гидратированных КФС-материалов зависит от температуры их синтеза, непосредственно влияющей на их фазовый состав и содержание различных кальций-фосфатов – прекурсоров ГАп.

Принимая во внимание гетерогенность состава низкотемпературного пастообразного материала, содержащего различные КФС, представляло интерес исследование полученных при физиологических температурах предшественников гидроксиапатита, таких как дигидрат дикальцийфосфата и октакальций фосфат для выявления наиболее биосовместимого кальций-фосфатного соединения. На основании проведенных исследований биологическую безопасность и остеокондуктивность данных соединений можно выстроить в ряд ДКФД > ОКФ > аГАп-НТ. Один из предполагаемых механизмов подобного явления может быть связан с неспецифической адгезией частиц КФС к клеточной поверхности с последующим нарушением внутриклеточных процессов.

Поскольку один из возможных механизмов цитотоксичности КФС может быть связан с выходом большого количества ионов Ca^{2+} из материала, был предложен способ повышения биосовместимости октакальций фосфата путем замещения в нем части ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} . Предложенный подход позволил значительно повысить биологическую безопасность и остеокондуктивность октакальций фосфата *in vitro* и *in vivo*.

Стоит отметить, что в проведенных исследованиях даже кондуктивные кальций-фосфаты не проявляли необходимых остеогенных свойств. В связи с этим был предложен подход радикального повышения остеогенного потенциала КФС за счет их сочетания с деминерализованным костным матриксом. Был разработан подход получения биомиметического реминерализованного композита за счет осаждения дигидрата дикальцийфосфата на поверхность трабекул деминерализованного костного матрикса и показаны его выраженные остеогенные свойства *in vivo*.

Таким образом, представленные в работе подходы открывают новые возможности для создания высокоэффективных остеопластических материалов для регенерации костной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Пастообразный гидратированный кальций-фосфатный ГАп-материал, полученный в результате низкотемпературного синтеза (20°C), обладает более выраженными признаками биологической безопасности и остеокондуктивности, чем его аналог после высокотемпературного синтеза (120°C);

2. Цитотоксичность *in vitro* различных кальций-фосфатных соединений (ДКФД, ОКФ и аГАп-НТ) более выражена для зависимых от прикрепления клеток, а их биологическая безопасность и остеокондуктивность *in vivo* убывает в ряду ДКФД>ОКФ>аГАп-НТ;

3. Частичное замещение ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} в структуре ОКФ значительно снижает степень его цитотоксичности *in vitro*, а также повышает его биологическую безопасность и остеокондуктивность *in vivo*;

4. Биомиметическая низкотемпературная реминерализация коллагенового костного матрикса посредством осаждения на его поверхность дикальцийфосфат дигидрата позволяет получать композитный материал с остеогенными свойствами.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Minaychev V.** Composite Remineralization of Bone-Collagen Matrices by Low-Temperature Ceramics and Serum Albumin: A New Approach to the Creation of Highly Effective Osteoplastic Materials / Minaychev V.V., Teterina A.Y., Smirnova P.V., Menshikh K.A., Senotov A.S., Kobyakova M.I., Smirnov I.V., Pyatina K.V., Krasnov K.S., Fadeev R.S., V. S. Komlev, I. S. Fadeeva // Journal of Functional Biomaterials. – 2024. – Т. 15. – №2:27;
2. **Minaychev V.** Low-Temperature Calcium Phosphate Ceramics Can Modulate Monocytes and Macrophages Inflammatory Response In Vitro / Minaychev V. V., Smirnova P. V., Kobyakova M. I., Teterina A. Y., Smirnov I. V., Skirda V. D., Alexandrov A. S., Gafurov M. R., Shlykov M. A., Pyatina K. V., Senotov A. S., Salynkin P. S., Fadeev R. S., Komlev V. S., Fadeeva I. S. // Biomedicines. – 2024. – Т. 12. – №2:263;
3. Teterina A. Injectable Hydrated Calcium Phosphate Bone-like Paste: Synthesis, In Vitro, and In Vivo Biocompatibility Assessment / A. Y. Teterina, **V. V. Minaychev**, P. V. Smirnova, M. I. Kobyakova, I. V. Smirnov, R. S. Fadeev, A. A. Egorov, A. A. Ashmarin, K. V. Pyatina, A. S. Senotov, I. S. Fadeeva, V. S. Komlev // Technologies. – 2023. – Т. 11. – № 77;
4. Fadeeva I. Biomimetic Remineralized Three-Dimensional Collagen Bone Matrices with an Enhanced Osteostimulating Effect / I.S. Fadeeva, A. Y. Teterina, **V. V. Minaychev**, A. S. Senotov, I. V. Smirnov, R. S. Fadeev, P. V. Smirnova, V. O. Menukhov, Y. V. Lomovskaya, V. S. Akatov, S. M. Barinov, V. S. Komlev // Biomimetics. – 2023. – Т. 8. – № 91;
5. Teterina A. Octacalcium Phosphate for Bone Tissue Engineering: Synthesis, Modification, and In Vitro Biocompatibility Assessment / A. Y. Teterina, I. V. Smirnov, I. S. Fadeeva, R. S. Fadeev, P. V. Smirnova, **V. V. Minaychev**, M. I. Kobyakova, A. Y. Fedotov, S. M. Barinov, V. S. Komlev // Int J Mol Sci. – 2021 – Т. 22. – № 23;
6. **Минайчев В.** Агрегация частиц наноразмерного гидроксиапатита и ингибирование им клеточной адгезии как ключевые факторы ограничения его биоинтеграции / В. В. Минайчев, П. О. Кирсанова, А. И. Звягина, А. С. Одинцова, И. С. Фадеева, В. С. Акатов // Биофизика. – 2019. – Т. 64. – № 5. – С. 945-949;
7. Панкратов А. Проблемы биоинтеграции микро- и нанокристаллического гидроксиапатита и подходы к их решению / А.С. Панкратов, И. С. Фадеева, В. В. **Минайчев**, П. О. Кирсанова, А. С. Сенотов, Ю. Б. Юрасова, В. С. Акатов // Гены и Клетки. – 2018. – Т.13. – № 3. – С. 46-51;

8. Телешев А. Гидроксиапатит для замещения дефектов костной ткани / А. Т. Телешев, В. Н. Горшенев, М. А. Яковлева, В. А. Фомичев, Р. С. Фадеев, **В. В. Минайчев**, В. С. Акатов // Медицинская техника. – 2018. – Т. 307. – № 1. – С. 13-16.

Патенты:

1. Сенотов А.С., Акатов В.С., Фадеева И.С., Кирсанова П.О., **Минайчев В.В.**, Фадеев Р.С. «Способ изготовления остеопластического материала из костной ткани». Патент на изобретение №2686309 от 25.04.2019, Бюл. №12

Основные тезисы конференций:

1. **Minaichev V.** Remineralization of Demineralized Bone Matrixes with Preserved Fibrillary Structure as a Promising Approach to Obtain Highly Effective Osteoplastic Materials / V. Minaichev, P. Smirnova, A. Senotov, A. Teterina, I. Fadeeva // BIO Web of Conferences. – 2023. – Т. 57. – № 04001;

2. **Minaychev V.** Limitation of biocompatibility of hydrated nanocrystalline hydroxyapatite / V. V. Minaychev, A. T. Teleshev, V. N. Gorshenev, M. A. Yakovleva, V. A. Fomichev, A. S. Pankratov, K. A. Menshikh, R. S. Fadeev, I. S. Fadeeva, A. S. Senotov, M. I. Kobayakova, Y. B. Yurasova, V. S. Akatov // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. – 2018. – Т. 347. – № 1;

3. Смирнова П.В. Разработка минерал-полимерных материалов, предназначенных для восстановления и регенерации утраченных костных тканей / Смирнова П.В., Смирнов И.В., Тетерина А.Ю., **Минайчев В.В.**, Фадеева И.С., Комлев В.С. // V Конгресс по регенеративной медицине. Гены и Клетки. Научно-практический журнал. Том XVII. Приложение, 2022, 23–25 ноября 2022 г., Москва, Россия, стр. 216.

4. **Минайчев В.В.** Исследование влияния кальцийфосфатных соединений, полученных методом низкотемпературной химической трансформации, на жизнеспособность клеток *in vitro* / Минайчев В. В., Фадеева И.С., Смирнов И.В., Тетерина А.Ю., Фадеев Р.С., Михеева П.В., Кобякова М.И., Звягина А.И., Акатов В.С. // III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. X российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. Том 2., 3-8 октября 2021, г. Сочи-Дагомыс, Россия, стр. 194.

5. **Minaychev V.V.**, Fadeeva I.S., Kirsanova P.O., Menshikh K.A., Senotov A.S., Akatov V.S. Aggregation of nanosized hydroxyapatite particles as the main limiting factor of nanosized hydroxyapatite based osteoplastic materials biointegration. / Minaychev V.V., Fadeeva I.S., Kirsanova P.O., Menshikh K.A., Senotov A.S., Akatov V.S. // Биологическая подвижность.

Материалы XII Всероссийского симпозиума, 17-19 мая 2019 г., Пущино, Россия, стр. 178-181.

6. **Минайчев В.В.** Повышение остеоиндуктивных свойств наноразмерного гидроксиапатита в его сочетании с остеокондуктивным коллагеновым матриксом / Минайчев В. В., Теплова П. О., Меньших К. А., Фадеева И. С., Звягина А. И., Одинцова А. С., Акатов В. С. // Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине. Гены и Клетки. Научно-практический журнал. Том XIV. Приложение, 20–23 ноября 2019 г., Москва, Россия, стр. 152.

7. **Минайчев В.В.** Слабые адгезионные свойства и агрегация как основные лимитирующие факторы биоинтеграции наноразмерного гидроксиапатита в организме / Минайчев В.В., Кирсанова П.О., Краснов К.С., Фадеева И.С., Акатов В.С. // Материалы VI Съезда биофизиков России, 16-21 сентября 2019 г., Сочи, Россия, стр. 158.

8. **Минайчев В.В.** Дозозависимый эффект наноразмерного гидроксиапатита в остеопластических материалах / Минайчев В.В., Кирсанова П. О., Фадеева И.С., Краснов К.С., Акатов В. С. // Сборник тезисов докладов VII научной молодежной школы-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции», 17-19 апреля 2019 г, Москва, Россия стр. 52.

9. Меньших К.А. Реминерализация костных матриц фосфатами кальция как способ повышения остеоиндуктивности / Меньших К. А., Сенотов А. С., **Минайчев В. В.**, Фадеева И. С., Фадеев Р. С., Кирсанова П. О., Акатов В. С. // Материалы 22 международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», 23-27 апреля 2018 г., Пущино, Россия, стр. 229;

10. **Минайчев В.В.** Синтез и свойства *in vivo* нанопаст на основе гидроксиапатита, предназначенных для реконструктивной хирургии костной ткани / Минайчев В.В., Сенотов А. С., Меньших К. А., А. И. Звягина А. И., Фадеева И. С., Акатов В. С. // Сборник тезисов X Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия», 25-28 октября 2017 г., Казань, Россия, стр. 44-46;

11. **Минайчев В.В.** Исследование биосовместимости паст на основе наноразмерного гидроксиапатита, разрабатываемых для малоинвазивной хирургии костной ткани / Минайчев В.В., Меньших К.А., Сенотов А.С., Кирсанова П.О., Звягина А.И., Фадеева И.С., Телешев А.Т., Акатов В.С. // Материалы третьего междисциплинарного молодежного научного форума с международным участием «Новые материалы», 21-24 ноября 2017 г., Москва, Россия, стр. 780-782;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карлов А. В. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики / А. В. Карлов, В. П. Шахов. – Томск:СТТ. – 2001. – 477 с.
2. Смирнов А. В. Строение и функции костной ткани в норме и при патологии / А. В. Смирнов, Румянцев А. Ш. // Нефрология. – 2014. – Т. 18. – № 6. – С. 9-25.
3. Телешев А. Т. Гидроксиапатит для замещения дефектов костной ткани / А. Т. Телешев, В. Н. Горшенев, М. А. Яковлева, В. А. Фомичев, Р. С. Фадеев, В. В. Минайчев, В. С. Акатов. – Т. 307. – № 1. – С. 13–16.
4. Agidigbi T. S. Reactive Oxygen Species in Osteoclast Differentiation and Possible Pharmaceutical Targets of ROS-Mediated Osteoclast Diseases / T. S. Agidigbi, C. Kim // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20. – № 14. – P. 3576.
5. Aguirre A. Extracellular calcium modulates in vitro bone marrow-derived Flk-1+ CD34+ progenitor cell chemotaxis and differentiation through a calcium-sensing receptor / A. Aguirre, A. González, J. A. Planell, E. Engel // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2010. – Vol. 393. – № 1. – P. 156–161.
6. Albee F. H. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis / F. H. Albee // Annals of Surgery. – 1920. – Vol. 71. – № 1. – P. 32–39.
7. Al-Sanabani J. S. Application of calcium phosphate materials in dentistry / J. S. Al-Sanabani, A. A. Madfa, F. A. Al-Sanabani // International Journal of Biomaterials. – 2013. – Vol. 2013. – №. 876132.
8. Amarasekara D. S. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks / D. S. Amarasekara, S. Kim, J. Rho // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 6. – P. 2851.
9. Amarasekara D. S. Bone Loss Triggered by the Cytokine Network in Inflammatory Autoimmune Diseases / D. S. Amarasekara, J. Yu, J. Rho // Journal of Immunology Research. – 2015. – Vol. 2015. – №. 832127.
10. Ambard A. J. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties / A. J. Ambard, L. Mueninghoff // Journal of Prosthodontics: Official Journal of the American College of Prosthodontists. – 2006. – Vol. 15. – № 5. – P. 321–328.
11. Amend S. R. Thrombospondin-1 regulates bone homeostasis through effects on bone matrix integrity and nitric oxide signaling in osteoclasts / S. R. Amend, O. Uluckan, M. Hurchla, D. Leib, D. V. Novack, M. Silva, W. Frazier, K. N. Weilbaeher // Journal of Bone and

Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research. – 2015. – Vol. 30. – № 1. – P. 106–115.

12. An L.-L. Complement C5a potentiates uric acid crystal-induced IL-1 β production / L.-L. An, P. Mehta, L. Xu, S. Turman, T. Reimer, B. Naiman, J. Connor, M. Sanjuan, R. Kolbeck, M. Fung // *European Journal of Immunology*. – 2014. – Vol. 44. – № 12. – P. 3669–3679.

13. Andersen O. Z. Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants / O. Z. Andersen, V. Offermanns, M. Sillassen, K. P. Almqvist, I. H. Andersen, S. Sørensen, C. S. Jeppesen, D. C. E. Kraft, J. Böttiger, M. Rasse, F. Kloss, M. Foss // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – № 24. – P. 5883–5890.

14. Andersen T. L. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone / T. L. Andersen, T. E. Sondergaard, K. E. Skorzynska, F. Dagnaes-Hansen, T. L. Plesner, E. M. Hauge, T. Plesner, J.-M. Delaisse // *The American Journal of Pathology*. – 2009. – Vol. 174. – № 1. – P. 239–247.

15. Anderson H. C. Matrix vesicles and calcification / H. C. Anderson // *Current Rheumatology Reports*. – 2003. – Vol. 5. – № 3. – P. 222–226.

16. Ansari S. Matrix Vesicles: Role in Bone Mineralization and Potential Use as Therapeutics / S. Ansari, B. W. M. de Wildt, M. A. M. Vis, C. E. de Korte, K. Ito, S. Hofmann, Y. Yuana // *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. – 2021. – Vol. 14. – № 4. – P. 289.

17. Azoidis I. The role of extracellular vesicles in biomineralisation: current perspective and application in regenerative medicine / I. Azoidis, S. C. Cox, O. G. Davies // *Journal of Tissue Engineering*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1–11.

18. Bai X. In vivo Protein Corona Formation: Characterizations, Effects on Engineered Nanoparticles' Biobehaviors, and Applications / X. Bai, J. Wang, Q. Mu, G. Su. – Текст : электронный // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 9. – № 646708.

19. Beck G. R. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression / G. R. Beck, B. Zerler, E. Moran // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – Vol. 97. – № 15. – P. 8352–8357.

20. Bakhshian Nik A. Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification / A. Bakhshian Nik, J. D. Hutcheson, E. Aikawa // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2017. – Vol. 4. – № 78.

21. Barberi J. Titanium and Protein Adsorption: An Overview of Mechanisms and Effects of Surface Features / J. Barberi, S. Spriano // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2021. – Vol. 14. – № 7. – P. 1590.

22. Barradas A. M. C. A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells / A. M. C. Barradas, H. A. M. Fernandes, N. Groen, Y. C. Chai, J. Schrooten, J. van de Peppel, J. P. T. M. van Leeuwen, C. A. van Blitterswijk, J. de Boer // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – № 11. – P. 3205–3215.

23. Barradas A. M. C. Molecular mechanisms of biomaterial-driven osteogenic differentiation in human mesenchymal stromal cells / A. M. C. Barradas, V. Monticone, M. Hulsman, C. Danoux, H. Fernandes, Z. Tahmasebi Birgani, F. Barrère-de Groot, H. Yuan, M. Reinders, P. Habibovic, C. van Blitterswijk, J. de Boer // *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*. – 2013. – Vol. 5. – № 7. – P. 920–931.

24. Barradas A. M. C. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms / A. M. C. Barradas, H. Yuan, C. A. van Blitterswijk, P. Habibovic // *European Cells & Materials*. – 2011. – Vol. 21. – P. 407–429;

25. Battafarano G. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering / G. Battafarano, M. Rossi, V. De Martino, F. Marampon, L. Borro, A. Secinaro, A. Del Fattore // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 3. – P. 1128.

26. Bauernfeind F. G. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression / F. G. Bauernfeind, G. Horvath, A. Stutz, E. S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B. G. Monks, K. A. Fitzgerald, V. Hornung, E. Latz // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2009. – Vol. 183. – Cutting edge. – № 2. – P. 787–791.

27. Beck G. R. Osteopontin regulation by inorganic phosphate is ERK1/2-, protein kinase C-, and proteasome-dependent / G. R. Beck, N. Knecht // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 43. – P. 41921–41929.

28. Bellahcène A. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer / A. Bellahcène, V. Castronovo, K. U. E. Ogbureke, L. W. Fisher, N. S. Fedarko // *Nature Reviews. Cancer*. – 2008. – Vol. 8. – № 3. – P. 212–226.

29. Belluoccio D. Deficiency of annexins A5 and A6 induces complex changes in the transcriptome of growth plate cartilage but does not inhibit the induction of mineralization / D. Belluoccio, I. Grskovic, A. Niehoff, U. Schlötzer-Schrehardt, S. Rosenbaum, J. Etich, C. Frie, F. Pausch, S. E. Moss, E. Pöschl, J. F. Bateman, B. Brachvogel // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 2010. – Vol. 25. – № 1. – P. 141–153.

30. Bhadada S. K. Role of Phosphate in Biomineralization / S. K. Bhadada, S. D. Rao // *Calcified Tissue International*. – 2021. – Vol. 108. – № 1. – P. 32–40.

31. Bishop J. R. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology / J. R. Bishop, M. Schuksz, J. D. Esko // *Nature*. – 2007. – Vol. 446. – № 7139. – P. 1030–1037.
32. Bolamperti S. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence / S. Bolamperti, I. Villa, A. Rubinacci // *Bone Research*. – 2022. – Vol. 10. – № 1. – P. 48.
33. Bonjour J.-P. Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health / J.-P. Bonjour // *Journal of the American College of Nutrition*. – 2011. – Vol. 30. – № 5 – P. 438–448.
34. Boonrungsiman S. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation / S. Boonrungsiman, E. Gentleman, R. Carzaniga, N. D. Evans, D. W. McComb, A. E. Porter, M. M. Stevens // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109. – № 35. – P. 14170–14175.
35. Boraldi F. Apoptosis in the Extraosseous Calcification Process / F. Boraldi, F. D. Lofaro, D. Quaglino // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 131.
36. Borciani G. Strontium Functionalization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering Purposes: A Biological Point of View / G. Borciani, G. Ciapetti, C. Vitale-Brovarone, N. Baldini // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 15. – № 5. – P. 1724.
37. Bose S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review / S. Bose, S. Tarafder // *Acta Biomaterialia*. – 2012. – Vol. 8. – № 4. – P. 1401–1421.
38. Boskey A. L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects / A. L. Boskey // *BoneKEY Reports*. – 2013. – Vol. 2. – P. 447.
39. Boskey A. L. Infrared analysis of the mineral and matrix in bones of osteonectin-null mice and their wildtype controls / A. L. Boskey, D. J. Moore, M. Amling, E. Canalis, A. M. Delany // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 2003. – Vol. 18. – № 6. – P. 1005–1011.
40. Bottini M. Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models / M. Bottini, S. Mebarek, K. L. Anderson, A. Strzelecka-Kiliszek, L. Bozycki, A. M. S. Simão, M. Bolean, P. Ciancaglini, J. B. Pikula, S. Pikula, D. Magne, N. Volkmann, D. Hanein, J. L. Millán, R. Buchet // *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*. – 2018. – Vol. 1862. – № 3. – P. 532–546.
41. Boulefour W. Deletion of OPN in BSP knockout mice does not correct bone hypomineralization but results in high bone turnover / W. Boulefour, L. Juignet, L. Verdière, I. Machuca-Gayet, M. Thomas, N. Laroche, A. Vanden-Bossche, D. Farlay, C. Thomas, E. Gineyts,

J. P. Concordet, J. B. Renaud, D. Aubert, M. Teixeira, O. Peyruchaud, L. Vico, M. H. Lafage-Proust, H. Follet, L. Malaval // *Bone*. – 2019. – Vol. 120. – P. 411–422.

42. Boyce B. F. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases / B. F. Boyce, D. E. Hughes, K. R. Wright, L. Xing, A. Dai // *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. – 1999. – Vol. 79. – № 2. – P. 83–94.

43. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

44. Cai X. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation / X. Cai, J. Chen, H. Xu, S. Liu, Q.-X. Jiang, R. Halfmann, Z. J. Chen // *Cell*. – 2014. – Vol. 156. – № 6. – P. 1207–1222.

45. Canillas M. Calcium phosphates for biomedical applications / M. Canillas, P. Pena, A. H. De Aza, M. A. Rodríguez // *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. – 2017. – Vol. 56. – № 3. – P. 91–112.

46. Capulli M. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers / M. Capulli, R. Paone, N. Rucci // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – Vol. 561. – P. 3–12.

47. Carter D. R. Bone compressive strength: the influence of density and strain rate / D. R. Carter, W. C. Hayes // *Science (New York, N.Y.)*. – 1976. – Vol. 194. – № 4270. – P. 1174–1176.

48. Cassel S. L. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis / S. L. Cassel, S. C. Eisenbarth, S. S. Iyer, J. J. Sadler, O. R. Colegio, L. A. Tephly, A. B. Carter, P. B. Rothman, R. A. Flavell, F. S. Sutterwala // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – № 26. – P. 9035–9040.

49. Castiglioni S. Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions / S. Castiglioni, A. Cazzaniga, W. Albisetti, J. A. M. Maier // *Nutrients*. – 2013. – Vol. 5. – Magnesium and osteoporosis. – № 8. – P. 3022–3033.

50. Chai Y. C. Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies / Y. C. Chai, A. Carlier, J. Bolander, S. J. Roberts, L. Geris, J. Schrooten, H. Van Oosterwyck, F. P. Luyten // *Acta Biomaterialia*. – 2012a. – Vol. 8. – № 11. – P. 3876–3887.

51. Chai Y. C. Mechanisms of ectopic bone formation by human osteoprogenitor cells on CaP biomaterial carriers / Y. C. Chai, S. J. Roberts, E. Desmet, G. Kerckhofs, N. van Gastel,

L. Geris, G. Carmeliet, J. Schrooten, F. P. Luyten // *Biomaterials*. – 2012b. – Vol. 33. – № 11. – P. 3127–3142.

52. Chai Y. C. Probing the osteoinductive effect of calcium phosphate by using an in vitro biomimetic model / Y. C. Chai, S. J. Roberts, J. Schrooten, F. P. Luyten // *Tissue Engineering. Part A*. – 2011. – Vol. 17. – № 7–8. – P. 1083–1097.

53. Chang H.-H. Neutralized Dicalcium Phosphate and Hydroxyapatite Biphasic Bioceramics Promote Bone Regeneration in Critical Peri-Implant Bone Defects / H.-H. Chang, C.-L. Yeh, Y.-L. Wang, K.-K. Fu, S.-J. Tsai, J.-H. Yang, C.-P. Lin // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2020. – Vol. 13. – № 4. – P. 823.

54. Charles J. F. Osteoclasts: more than «bone eaters» / J. F. Charles, A. O. Aliprantis // *Trends in Molecular Medicine*. – 2014. – Vol. 20. – Osteoclasts. – № 8. – P. 449–459.

55. Chaubey A. Surface patterning: tool to modulate stem cell differentiation in an adipose system / A. Chaubey, K. J. Ross, R. M. Leadbetter, K. J. L. Burg // *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. – 2008. – Vol. 84. – № 1. – P. 70–78.

56. Chaudhary S. C. Phosphate induces formation of matrix vesicles during odontoblast-initiated mineralization in vitro / S. C. Chaudhary, M. Kuzynski, M. Bottini, E. Beniash, T. Dokland, C. G. Mobley, M. C. Yadav, A. Poliard, O. Kellermann, J. L. Millán, D. Napierala // *Matrix Biology*. – 2016. – Vol. 52–54. – P. 284–300.

57. Chen H. Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure / H. Chen, B. H. Clarkson, K. Sun, J. F. Mansfield // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2005. – Vol. 288. – № 1. – P. 97–103.

58. Chen L. Antibacterial and Osteoinductive Properties of Icaritin-Metronidazole/Calcium Phosphate Cement Sustained Release System / L. Chen, Q. Yan, T. Wu, W. Sun, B. Shi // *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. – 2017. – Vol. 7. – P. 437–447.

59. Chen X. Autophagy induced by calcium phosphate precipitates targets damaged endosomes / X. Chen, B. Khambu, H. Zhang, W. Gao, M. Li, X. Chen, T. Yoshimori, X.-M. Yin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2014a. – Vol. 289. – № 16. – P. 11162–11174.

60. Chen X. Roles of calcium phosphate-mediated integrin expression and MAPK signaling pathways in the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells / X. Chen, J. Wang, Y. Chen, H. Cai, X. Yang, X. Zhu, Y. Fan, X. Zhang // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2016. – Vol. 4. – № 13. – P. 2280–2289.

61. Chen Y. Enhanced effect of β -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence / Y. Chen, J. Wang, X. D. Zhu,

Z. R. Tang, X. Yang, Y. F. Tan, Y. J. Fan, X. D. Zhang // *Acta Biomaterialia*. – 2015. – Vol. 11. – P. 435–448.

62. Chen Z. Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by β -tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway / Z. Chen, C. Wu, W. Gu, T. Klein, R. Crawford, Y. Xiao // *Biomaterials*. – 2014b. – Vol. 35. – № 5. – P. 1507–1518.

63. Chenu C. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells / C. Chenu, S. Colucci, M. Grano, P. Zigrino, R. Barattolo, G. Zambonin, N. Baldini, P. Vergnaud, P. D. Delmas, A. Z. Zallone // *The Journal of Cell Biology*. – 1994. – Vol. 127. – № 4. – P. 1149–1158.

64. Cianferotti L. The calcium-sensing receptor in bone metabolism: from bench to bedside and back / L. Cianferotti, A. R. Gomes, S. Fabbri, A. Tanini, M. L. Brandi // *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. – 2015. – Vol. 26. – № 8. – P. 2055–2071.

65. Ciosek Ż. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue / Ż. Ciosek, K. Kot, D. Kosik-Bogacka, N. Łanocha-Arendarczyk, I. Rotter // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – № 4. – P. 506.

66. Ciosek Ż. Iron, Zinc, Copper, Cadmium, Mercury, and Bone Tissue / Ż. Ciosek, K. Kot, I. Rotter // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2023. – Vol. 20. – № 3. – P. 2197.

67. Clapham D. E. Calcium signaling / D. E. Clapham // *Cell*. – 2007. – Vol. 131. – № 6. – P. 1047–1058.

68. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology / B. Clarke // *Clinical journal of the American Society of Nephrology*. – 2008. – Vol. 3. – № 3. – P.131-139.

69. Clezardin P. Complex formation of human thrombospondin with osteonectin / P. Clezardin, L. Malaval, A. S. Ehrensperger, P. D. Delmas, M. Dechavanne, J. L. McGregor // *European Journal of Biochemistry*. – 1988. – Vol. 175. – № 2. – P. 275–284.

70. Cölfen H. Biomineralization: A crystal-clear view / H. Cölfen // *Nature Materials*. – 2010. – Vol. 9. – Biomineralization. – № 12. – P. 960–961.

71. Collett G. D. M. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification / G. D. M. Collett, A. E. Canfield // *Circulation Research*. – 2005. – Vol. 96. – № 9. – P. 930–938.

72. Coulson-Thomas Y. M. The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth / Y. M. Coulson-Thomas, V. J. Coulson-Thomas, A. L.

Norton, T. F. Gesteira, R. P. Cavalheiro, M. C. Z. Meneghetti, J. R. Martins, R. A. Dixon, H. B. Nader // *PloS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 6.

73. Crockett J. C. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis / J. C. Crockett, D. J. Mellis, D. I. Scott, M. H. Helfrich // *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. – 2011. – Vol. 22. – № 1. – P. 1–20.

74. Daculsi G. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization / G. Daculsi, R. Z. LeGeros, E. Nery, K. Lynch, B. Kerebel // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1989. – Vol. 23. – № 8. – P. 883–894.

75. Dalby M. J. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder / M. J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M. O. Riehle, P. Herzyk, C. D. W. Wilkinson, R. O. C. Oreffo // *Nature Materials*. – 2007. – Vol. 6. – № 12. – P. 997–1003.

76. Dallas S. L. The osteocyte: an endocrine cell ... and more / S. L. Dallas, M. Prideaux, L. F. Bonewald // *Endocrine Reviews*. – 2013. – Vol. 34. – № 5. – P. 658–690.

77. Danoux C. B. In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration / C. B. Danoux, D. Barbieri, H. Yuan, J. D. de Bruijn, C. A. van Blitterswijk, P. Habibovic // *Biomatter*. – 2014. – Vol. 4.

78. De Groot J. Carriers that concentrate native bone morphogenetic protein in vivo / J. De Groot // *Tissue Engineering*. – 1998. – Vol. 4. – № 4. – P. 337–341.

79. Delany A. M. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice / A. M. Delany, M. Amling, M. Priemel, C. Howe, R. Baron, E. Canalis // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2000. – Vol. 105. – № 7. – P. 915–923.

80. Delany A. M. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling / A. M. Delany, K. D. Hankenson // *Journal of Cell Communication and Signaling*. – 2009. – Vol. 3. – № 3–4. – P. 227–238.

81. Denry I. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering / I. Denry, L. T. Kuhn // *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*. – 2016. – Vol. 32. – № 1. – P. 43–53.

82. Deschaseaux F. Mechanisms of bone repair and regeneration / F. Deschaseaux, L. Sensébé, D. Heymann // *Trends in Molecular Medicine*. – 2009. – Vol. 15. – № 9. – P. 417–429.

83. Dimitriou R. Current concepts of molecular aspects of bone healing / R. Dimitriou, E. Tsiridis, P. V. Giannoudis // *Injury*. – 2005. – Vol. 36. – № 12. – P. 1392–1404.

84. Dobson P. F. Mitochondrial dysfunction impairs osteogenesis, increases osteoclast activity, and accelerates age related bone loss / P. F. Dobson, E. P. Dennis, D. Hipps, A. Reeve, A. Laude, C. Bradshaw, C. Stamp, A. Smith, D. J. Deehan, D. M. Turnbull, L. C. Greaves // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 11643.
85. Domagala A. Typical and Atypical Inducers of Lysosomal Cell Death: A Promising Anticancer Strategy / A. Domagala, K. Fidy, M. Bobrowicz, J. Stachura, K. Szczygiel, M. Firczuk // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – Typical and Atypical Inducers of Lysosomal Cell Death. – № 8. – P. 2256.
86. Donahue H. J. Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function / H. J. Donahue, K. J. McLeod, C. T. Rubin, J. Andersen, E. A. Grine, E. L. Hertzberg, P. R. Brink // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 1995. – Vol. 10. – № 6. – P. 881–889.
87. Dong L. Harnessing the power of macrophages/monocytes for enhanced bone tissue engineering / L. Dong, C. Wang // *Trends in Biotechnology*. – 2013. – Vol. 31. – № 6. – P. 342–346.
88. Dorozhkin S. V. Functionalized calcium orthophosphates (CaPO₄) and their biomedical applications / S. V. Dorozhkin // *Journal of Materials Chemistry. B*. – 2019. – Vol. 7. – № 47. – P. 7471–7489.
89. Dostert C. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica / C. Dostert, V. Pétrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman, J. Tschopp // *Science (New York, N.Y.)*. – 2008. – Vol. 320. – № 5876. – P. 674–677.
90. Ducy P. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice / P. Ducy, C. Desbois, B. Boyce, G. Pinero, B. Story, C. Dunstan, E. Smith, J. Bonadio, S. Goldstein, C. Gundberg, A. Bradley, G. Karsenty // *Nature*. – 1996. – Vol. 382. – № 6590. – P. 448–452.
91. Eggenhofer E. The life and fate of mesenchymal stem cells / E. Eggenhofer, F. Luk, M. H. Dahlke, M. J. Hoogduijn // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 148.
92. Eisenbarth S. C. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants / S. C. Eisenbarth, O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell // *Nature*. – 2008. – Vol. 453. – № 7198. – P. 1122–1126.
93. Eliaz N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications / N. Eliaz, N. Metoki // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2017. – Vol. 10. – № 4. – P. 334.

94. Erlebacher A. Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling / A. Erlebacher, E. H. Filvaroff, J. Q. Ye, R. Derynck // *Molecular Biology of the Cell*. – 1998. – Vol. 9. – № 7. – P. 1903–1918.
95. Everts V. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation / V. Everts, J. M. Delaissé, W. Korper, D. C. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, W. Beertsen // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 2002. – Vol. 17. – P. 77–90.
96. Fadeeva I. S. Biomimetic Remineralized Three-Dimensional Collagen Bone Matrices with an Enhanced Osteostimulating Effect / I. S. Fadeeva, A. Y. Teterina, V. V. Minaychev, A. S. Senotov, I. V. Smirnov, R. S. Fadeev, P. V. Smirnova, V. O. Menukhov, Y. V. Lomovskaya, V. S. Akatov, S. M. Barinov, V. S. Komlev // *Biomimetics (Basel, Switzerland)*. – 2023. – T. 8. – № 1. – P. 91.
97. Fakhry M. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts / M. Fakhry, E. Hamade, B. Badran, R. Buchet, D. Magne // *World Journal of Stem Cells*. – 2013. – Vol. 5. – № 4. – P. 136–148.
98. Finkelman R. D. Appearance of dentin gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing rat molars in vitro / R. D. Finkelman, W. T. Butler // *Journal of Dental Research*. – 1985. – Vol. 64. – № 7. – P. 1008–1015.
99. Florencio-Silva R. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells / R. Florencio-Silva, G. R. da S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, P. S. Cerri // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 421746.
100. Franchi L. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation / L. Franchi, T. Eigenbrod, G. Núñez // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2009. – Vol. 183. – № 2. – P. 792–796.
101. Franklin B. S. Crystal Formation in Inflammation / B. S. Franklin, M. S. Mangan, E. Latz // *Annual Review of Immunology*. – 2016. – Vol. 34. – P. 173–202.
102. Franz-Odenaal T. A. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes / T. A. Franz-Odenaal, B. K. Hall, P. E. Witten // *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. – 2006. – Vol. 235. – № 1. – P. 176–190.
103. Furko M. Calcium Phosphate Loaded Biopolymer Composites—A Comprehensive Review on the Most Recent Progress and Promising Trends / M. Furko, K. Balázs, C. Balázs // *Coatings*. – 2023. – Vol. 13. – № 2. – P. 360.

104. Gaffney-Stomberg E. The Impact of Trace Minerals on Bone Metabolism / E. Gaffney-Stomberg // *Biological Trace Element Research*. – 2019. – Vol. 188. – № 1. – P. 26–34.
105. Gambini E. Differences in Mitochondrial Membrane Potential Identify Distinct Populations of Human Cardiac Mesenchymal Progenitor Cells / E. Gambini, I. Martinelli, I. Stadiotti, M. C. Vinci, A. Scopece, L. Eramo, E. Sommariva, J. Resta, S. Benaouadi, E. Cogliati, A. Paolin, A. Parini, G. Pompilio, F. Savagner // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 20. – P. 7467.
106. Gambles M. T. Crosslinking of CD38 Receptors Triggers Apoptosis of Malignant B Cells / M. T. Gambles, J. Li, J. Wang, D. Sborov, J. Yang, J. Kopeček // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2021. – Vol. 26. – № 15. – P. 4658.
107. García-Gareta E. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration / E. García-Gareta, M. J. Coathup, G. W. Blunn // *Bone*. – 2015. – Vol. 81. – P. 112–121.
108. GBD 2019 Fracture Collaborators. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019 / GBD 2019 Fracture Collaborators // *The Lancet. Healthy Longevity*. – 2021. – Vol. 2. – № 9. – P. 580–592.
109. Gelli R. The importance of being amorphous: calcium and magnesium phosphates in the human body / R. Gelli, F. Ridi, P. Baglioni // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2019. – Vol. 269. – The importance of being amorphous. – P. 219–235.
110. Geng Z. Nanosized strontium substituted hydroxyapatite prepared from egg shell for enhanced biological properties / Z. Geng, Y. Cheng, L. Ma, Z. Li, Z. Cui, S. Zhu, Y. Liang, Y. Liu, H. Bao, X. Li, X. Yang // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2018. – Vol. 32. – № 7. – P. 896–905.
111. Gilbert P. U. P. A. Biomineralization: Integrating mechanism and evolutionary history / P. U. P. A. Gilbert, K. D. Bergmann, N. Boekelheide, S. Tambutté, T. Mass, F. Marin, J. F. Adkins, J. Erez, B. Gilbert, V. Knutson, M. Cantine, J. O. Hernández, A. H. Knoll // *Science Advances*. – 2022. – Vol. 8. – № 10.
112. Ginebra M.-P. Bioceramics and bone healing / M.-P. Ginebra, M. Espanol, Y. Maazouz, V. Bergez, D. Pastorino // *EFORT open reviews*. – 2018. – Vol. 3. – № 5. – P. 173–183.
113. Golub E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization / E. E. Golub // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2009. – Vol. 1790. – № 12. – P. 1592–1598.

114. González-Vázquez A. Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells / A. González-Vázquez, J. A. Planell, E. Engel // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10. – № 6. – P. 2824–2833.
115. Habibovic P. Bioinorganics and biomaterials: bone repair / P. Habibovic, J. E. Barralet // *Acta Biomaterialia*. – 2011. – Vol. 7. – № 8. – P. 3013–3026.
116. Habibovic P. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants / P. Habibovic, U. Gbureck, C. J. Doillon, D. C. Bassett, C. A. van Blitterswijk, J. E. Barralet // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29. – № 7. – P. 944–953.
117. Habibovic P. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair / P. Habibovic, K. de Groot // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2007. – Vol. 1. – № 1. – P. 25–32.
118. Hallab N. J. Biologic effects of implant debris / N. J. Hallab, J. J. Jacobs // *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*. – 2009. – Vol. 67. – № 2. – P. 182–188.
119. Hannink G. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? / G. Hannink, J. J. C. Arts // *Injury*. – 2011. – Vol. 42 – P. 22-25.
120. Hao J. Strontium hydroxyapatite in situ gel-forming system - a new approach for minimally invasive bone augmentation / J. Hao, J. Chou, S. Kuroda, M. Otsuka, S. Kasugai, N. P. Lang // *Clinical Oral Implants Research*. – 2015. – Vol. 26. – № 5. – P. 581–585.
121. Hari A. Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact / A. Hari, Y. Zhang, Z. Tu, P. Detampel, M. Stenner, A. Ganguly, Y. Shi // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – P. 7281.
122. Harrison C. J. Nanoscale Strontium-Substituted Hydroxyapatite Pastes and Gels for Bone Tissue Regeneration / C. J. Harrison, P. V. Hatton, P. Gentile, C. A. Miller // *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. – 2021. – Vol. 11. – № 6. – P. 1611.
123. Hasegawa T. Morphological assessment of bone mineralization in tibial metaphyses of ascorbic acid-deficient ODS rats / T. Hasegawa, M. Li, K. Hara, M. Sasaki, C. Tabata, P. H. L. de Freitas, H. Hongo, R. Suzuki, M. Kobayashi, K. Inoue, T. Yamamoto, N. Oohata, K. Oda, Y. Akiyama, N. Amizuka // *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*. – 2011. – Vol. 32. – № 4. – P. 259–269.
124. Hasegawa T. Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization / T. Hasegawa // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2018. – Vol. 149. – № 4. – P. 289–304.

125. Hasegawa T. Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization / T. Hasegawa, T. Yamamoto, E. Tsuchiya, H. Hongo, K. Tsuboi, A. Kudo, M. Abe, T. Yoshida, T. Nagai, N. Khadiza, A. Yokoyama, K. Oda, H. Ozawa, P. H. L. de Freitas, M. Li, N. Amizuka // *The Japanese Dental Science Review*. – 2017. – Vol. 53. – № 2. – P. 34–45.
126. Hauge E. M. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers / E. M. Hauge, D. Qvesel, E. F. Eriksen, L. Mosekilde, F. Melsen // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 2001. – Vol. 16. – № 9. – P. 1575–1582.
127. Hauschka P. V. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone / P. V. Hauschka, J. B. Lian, D. E. Cole, C. M. Gundberg // *Physiological Reviews*. – 1989. –. 69. – № 3. – P. 990–1047.
128. Heymann D. Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation / D. Heymann, G. Pradal, M. Benahmed // *Histology and Histopathology*. – 1999. – Vol. 14. – № 3. – P. 871–877.
129. Hileman R. E. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins / R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. M. Weiler, R. J. Linhardt // *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. – 1998. – Vol. 20. – № 2. – P. 156–167.
130. Hirayama B. Immune cell response and subsequent bone formation induced by implantation of octacalcium phosphate in a rat tibia defect / B. Hirayama, T. Anada, Y. Shiwaku, N. Miyatake, K. Tsuchiya, M. Nakamura, T. Takahashi, O. Suzuki // *RSC Adv*. – 2016. – Vol. 6. – P. 57475–57484.
131. Hoersch S. Periostin shows increased evolutionary plasticity in its alternatively spliced region / S. Hoersch, M. A. Andrade-Navarro // *BMC evolutionary biology*. – 2010. – Vol. 10. – №. 30.
132. Hong Y. Fabrication, Biological Effects, and Medical Applications of Calcium Phosphate Nanoceramics / Y. Hong, H. Fan, B. Li, B. Guo, M. Liu, X. Zhang // *Materials Science and Engineering: R: Reports*. – 2010. – Vol. 70. – P. 225–242.
133. Hornung V. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization / V. Hornung, F. Bauernfeind, A. Halle, E. O. Samstad, H. Kono, K. L. Rock, K. A. Fitzgerald, E. Latz // *Nature Immunology*. – 2008. – Vol. 9. – № 8. – P. 847–856.

134. Hornung V. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation / V. Hornung, E. Latz // *European Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 40. – № 3. – P. 620–623.
135. Hoshi M. Preparation of Collagen/Hydroxyapatite Composites Using the Alternate Immersion Method and Evaluation of the Cranial Bone-Forming Capability of Composites Complexed with Acidic Gelatin and b-FGF / M. Hoshi, M. Taira, T. Sawada, Y. Hachinohe, W. Hatakeyama, K. Takafuji, S. Tekemoto, H. Kondo // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 15. – № 24. – P. 8802.
136. Hou X. Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair / X. Hou, L. Zhang, Z. Zhou, X. Luo, T. Wang, X. Zhao, B. Lu, F. Chen, L. Zheng // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2022. – Vol. 13. – № 4. – P. 187.
137. Huang T. Effect of mitophagy in the formation of osteomorphs derived from osteoclasts / T. Huang, Y. Wang, Z. Yu, X. Miao, Z. Jiang, K. Yu, M. Fu, K. Lai, Y. Wang, G. Yang // *iScience*. – 2023. – Vol. 26. – № 5. – P. 106682.
138. Iwayama T. Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization / T. Iwayama, T. Okada, T. Ueda, K. Tomita, S. Matsumoto, M. Takedachi, S. Wakisaka, T. Noda, T. Ogura, T. Okano, P. Fratzl, T. Ogura, S. Murakami // *Science Advances*. – 2019. – Vol. 5. – № 7.
139. Jani P. H. Transgenic expression of Dsp⁺ partially rescued the long bone defects of Dmp1-null mice / P. H. Jani, M. P. Gibson, C. Liu, H. Zhang, X. Wang, Y. Lu, C. Qin // *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. – 2016. – Vol. 52–54. – P. 95–112.
140. Jebahi S. Biological therapy of strontium-substituted bioglass for soft tissue wound-healing: responses to oxidative stress in ovariectomised rats / S. Jebahi, H. Oudadesse, N. Jardak, I. Khayat, H. Keskes, A. Khabir, T. Rebai, H. El Feki, A. El Feki // *Annales Pharmaceutiques Francaises*. – 2013. – Vol. 71. – № 4. – P. 234–242.
141. Jiang Y.-H. Cross-linking methods of type I collagen-based scaffolds for cartilage tissue engineering / Y.-H. Jiang, Y.-Y. Lou, T.-H. Li, B.-Z. Liu, K. Chen, D. Zhang, T. Li // *American Journal of Translational Research*. – 2022. – Vol. 14. – № 2. – P. 1146–1159.
142. Jung G. Y. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation / G. Y. Jung, Y. J. Park, J. S. Han // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2010. – Vol. 21. – № 5. – P. 1649–1654.
143. Kaipatur N. R. Matrix Gla protein inhibition of tooth mineralization / N. R. Kaipatur, M. Murshed, M. D. McKee // *Journal of Dental Research*. – 2008. – T. 87. – № 9. – C. 839–844.

144. Kajiya H. Calcium signaling in osteoclast differentiation and bone resorption / H. Kajiya // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – Vol. 740. – P. 917–932.
145. Kandori K. Microcalorimetric study of protein adsorption onto calcium hydroxyapatites / K. Kandori, K. Murata, T. Ishikawa // *Langmuir*. – 2007. – Vol. 23. – № 4. – P. 2064–2070.
146. Kamakura S. Differences of Bone Regeneration by Various Calcium Phosphate/Collagen Composites / S. Kamakura, K. Sasaki, Y. Honda, T. Masuda, T. Anada, T. Kawai, A. Matsui, M. Keiko, S. Echigo, O. Suzuki // *Key Engineering Materials*. – 2008. – Vol. 361–363. – P. 1229–1232.
147. Kawai T. First clinical application of octacalcium phosphate collagen composite in human bone defect / T. Kawai, S. Echigo, K. Matsui, Y. Tanuma, T. Takahashi, O. Suzuki, S. Kamakura // *Tissue Engineering. Part A*. – 2014. – Vol. 20. – № 7–8. – P. 1336–1341.
148. Kelm R. J. The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation / R. J. Kelm, K. G. Mann // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – Vol. 266. – № 15. – P. 9632–9639.
149. Khoshniat S. Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium / S. Khoshniat, A. Bourguine, M. Julien, M. Petit, P. Pilet, T. Rouillon, M. Masson, M. Gatus, P. Weiss, J. Guicheux, L. Beck // *Bone*. – 2011. – Vol. 48. – № 4. – P. 894–902.
150. Kim D. In Situ Evaluation of Calcium Phosphate Nucleation Kinetics and Pathways during Intra- and Extrafibrillar Mineralization of Collagen Matrices / D. Kim, B. Lee, S. Thomopoulos, Y.-S. Jun // *Crystal Growth & Design*. – 2016. – Vol. 16. – № 9. – P. 5359–5366.
151. Kim J. Biomimetic Octacalcium Phosphate Bone Has Superior Bone Regeneration Ability Compared to Xenogeneic or Synthetic Bone / J. Kim, S. Kim, I. Song // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2021. – Vol. 14. – № 18. – P. 5300.
152. Kim J. Octacalcium phosphate, a promising bone substitute material: a narrative review / J. Kim, S. Kim, I. Song // *Journal of Yeungnam Medical Science*. – 2024. – Vol. 41. – № 1 – P. 4-12.
153. Kirby D. J. Isolation, production, and analysis of small leucine-rich proteoglycans in bone / D. J. Kirby, M. F. Young // *Methods in Cell Biology*. – 2018. – Vol. 143. – P. 281–296.
154. Kirsch T. Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization / T. Kirsch, H. D. Nah, D. R. Demuth, G. Harrison, E. E. Golub, S. L. Adams, M. Pacifici // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36. – № 11. – P. 3359–3367.

155. Klar R. M. Calcium ions and osteoclastogenesis initiate the induction of bone formation by coral-derived macroporous constructs / R. M. Klar, R. Duarte, T. Dix-Peek, C. Dickens, C. Ferretti, U. Ripamonti // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2013. – Vol. 17. – № 11. – P. 1444–1457.
156. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2 / T. Komori // *Cell and Tissue Research*. – 2010. – Vol. 339. – № 1. – P. 189–195.
157. Kumar R. Chitosan-mediated crystallization and assembly of hydroxyapatite nanoparticles into hybrid nanostructured films / R. Kumar, K. H. Prakash, P. Cheang, L. Gower, K. A. Khor // *Journal of the Royal Society, Interface*. – 2008. – Vol. 5. – № 21. – P. 427–439.
158. Kuroda E. Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms / E. Kuroda, K. J. Ishii, S. Uematsu, K. Ohata, C. Coban, S. Akira, K. Aritake, Y. Urade, Y. Morimoto // *Immunity*. – 2011. – Vol. 34. – № 4. – P. 514–526.
159. Laquerriere P. MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in the presence of different forms of hydroxyapatite particles / P. Laquerriere, A. Grandjean-Laquerriere, S. Addadi-Rebbah, E. Jallot, D. Laurent-Maquin, P. Frayssinet, M. Guenounou // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25. – № 13. – P. 2515–2524.
160. Laquerriere P. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro / P. Laquerriere, A. Grandjean-Laquerriere, E. Jallot, G. Balossier, P. Frayssinet, M. Guenounou // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – № 16. – P. 2739–2747.
161. Laskus A. Ionic Substitutions in Non-Apatitic Calcium Phosphates / A. Laskus, J. Kolmas // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – № 12. – P. 2542.
162. Le B. Q. The Components of Bone and What They Can Teach Us about Regeneration / B. Q. Le, V. Nurcombe, S. M. Cool, C. A. van Blitterswijk, J. de Boer, V. L. S. LaPointe // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2017. – Vol. 11. – № 1. – P. 14.
163. Le Nihouannen D. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles / D. Le Nihouannen, G. Daculsi, A. Saffarzadeh, O. Gauthier, S. Delplace, P. Pilet, P. Layrolle // *Bone*. – 2005. – Vol. 36. – № 6. – P. 1086–1093.
164. Le Nihouannen D. Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite / D. Le Nihouannen, A. Saffarzadeh, O. Gauthier, F. Moreau, P. Pilet, R. Spaethe, P. Layrolle, G. Daculsi // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 2008. – Vol. 19. – № 2. – P. 667–675.

165. Lee K. W. Physical properties and cellular responses to crosslinkable poly(propylene fumarate)/hydroxyapatite nanocomposites / K. W. Lee, S. Wang, M. J. Yaszemski, L. Lu // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29. – № 19. – P. 2839–2848.
166. Leeuwenburgh S. C. G. Mineralization, biodegradation, and drug release behavior of gelatin/apatite composite microspheres for bone regeneration / S. C. G. Leeuwenburgh, J. Jo, H. Wang, M. Yamamoto, J. A. Jansen, Y. Tabata // *Biomacromolecules*. – 2010. – Vol. 11. – № 10. – P. 2653–2659.
167. LeGeros R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials / R. Z. LeGeros // *Chemical Reviews*. – 2008. – Vol. 108. – № 11. – P. 4742–4753.
168. Leidi M. High magnesium inhibits human osteoblast differentiation in vitro / M. Leidi, F. Dellera, M. Mariotti, J. A. M. Maier // *Magnesium Research*. – 2011. – Vol. 24. – № 1. – P. 1–6.
169. Levingstone T. J. Calcium Phosphate Nanoparticles for Therapeutic Applications in Bone Regeneration / T. J. Levingstone, S. Herbaj, N. J. Dunne // *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. – 2019. – Vol. 9. – № 11. – P. 1570.
170. Li B. Fabrication and cellular biocompatibility of porous carbonated biphasic calcium phosphate ceramics with a nanostructure / B. Li, X. Chen, B. Guo, X. Wang, H. Fan, X. Zhang // *Acta Biomaterialia*. – 2009. – Vol. 5. – № 1. – P. 134–143.
171. Li J. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery / J. Li, Y.-C. Chen, Y.-C. Tseng, S. Mozumdar, L. Huang // *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. – 2010. – Vol. 142. – № 3. – C. 416–421.
172. Li P. Resilient and flexible chitosan/silk cryogel incorporated with Ag/Sr co-doped nanoscale hydroxyapatite for osteoinductivity and antibacterial properties / P. Li, Z. Jia, Q. Wang, T. Pengfei, M. Wang, K. Wang, J. Fang, C. Zhao, F. Ren, X. Ge, X. Lu // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2018. – Vol. 6. – № 45 – P. 7427-7438.
173. Lima H. Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death / H. Lima, L. S. Jacobson, M. F. Goldberg, K. Chandran, F. Diaz-Griffero, M. P. Lisanti, J. Brojatsch // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. – 2013. – Vol. 12. – № 12. – P. 1868–1878.
174. Linde F. Energy absorptive properties of human trabecular bone specimens during axial compression / F. Linde, I. Hvid, B. Pongsoipetch // *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. – 1989. – Vol. 7. – № 3. – P. 432–439.
175. Liu X. 3D-printed bioactive ceramic scaffolds with biomimetic micro/nano-HAp surfaces mediated cell fate and promoted bone augmentation of the bone-implant interface in vivo

/ X. Liu, Y. Miao, H. Liang, J. Diao, L. Hao, Z. Shi, N. Zhao, Y. Wang // *Bioactive Materials*. – 2022. – Vol. 12. – P. 120–132.

176. Liu Z. Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: the origination of material cytotoxicity / Z. Liu, Y. Xiao, W. Chen, Y. Wang, B. Wang, G. Wang, X. Xu, R. Tang // *Journal of Materials Chemistry. B*. – 2014. – Vol. 2. – № 22. – P. 3480–3489.

177. Lotsari A. Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite / A. Lotsari, A. K. Rajasekharan, M. Halvarsson, M. Andersson // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 4170.

178. Lu A. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes / A. Lu, V. G. Magupalli, J. Ruan, Q. Yin, M. K. Atianand, M. R. Vos, G. F. Schröder, K. A. Fitzgerald, H. Wu, E. H. Egelman // *Cell*. – 2014. – Vol. 156. – № 6. – P. 1193–1206.

179. Lu J. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone / J. Lu, M. Descamps, J. Dejou, G. Koubi, P. Hardouin, J. Lemaitre, J.-P. Proust // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2002. – Vol. 63. – № 4. – P. 408–412.

180. Lu J. Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review / J. Lu, H. Yu, C. Chen // *RSC advances*. – 2018. – Vol. 8. – № 4. – P. 2015–2033.

181. Lukaszewska-Kuska M. Osteoblastic cell behaviour on modified titanium surfaces / M. Lukaszewska-Kuska, P. Wirstlein, R. Majchrowski, B. Dorocka-Bobkowska // *Micron (Oxford, England: 1993)*. – 2018. – Vol. 105. – P. 55–63.

182. Lukina Y. Calcium Phosphate Cements as Carriers of Functional Substances for the Treatment of Bone Tissue / Y. Lukina, T. Safronova, D. Smolentsev, O. Toshev // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2023. – Vol. 16. – № 11. – P. 4017.

183. Luo Y. 3D printing of strontium-doped hydroxyapatite based composite scaffolds for repairing critical-sized rabbit calvarial defects / Y. Luo, S. Chen, Y. Shi, J. Ma // *Biomedical Materials (Bristol, England)*. – 2018. – Vol. 13. – № 6. – P. 065004.

184. Manolagas S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis / S. C. Manolagas // *Endocrine Reviews*. – 2000. – Vol. 21. – № 2. – P. 115–137.

185. Marconi G. D. Human Periodontal Ligament Stem Cells Response to Titanium Implant Surface: Extracellular Matrix Deposition / G. D. Marconi, L. Fonticoli, Y. Della Rocca, T. S. Rajan, A. Piattelli, O. Trubiani, J. Pizzicannella, F. Diomedea // *Biology*. – 2021. – Vol. 10. – № 9. – P. 931.

186. Marino G. Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study / G. Marino, F. Rosso, G. Cafiero, C. Tortora, M. Moraci, M. Barbarisi, A. Barbarisi // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 2010. – Vol. 21. – № 1. – P. 353–363.

187. Marinovich R. The role of bone sialoprotein in the tendon-bone insertion / R. Marinovich, Y. Soenjaya, G. Q. Wallace, A. Zuskov, A. Dunkman, B. L. Foster, M. Ao, K. Bartman, V. Lam, A. Rizkalla, F. Beier, M. J. Somerman, D. W. Holdsworth, L. J. Soslowsky, F. Lagugn -Labarhet, H. A. Goldberg // *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. – 2016. – Vol. 52–54. – P. 325–338.

188. Martinon F. The inflammasomes: guardians of the body / F. Martinon, A. Mayor, J. Tschopp // *Annual Review of Immunology*. – 2009. – T. 27. – The inflammasomes. – C. 229–265.

189. Marx D. A review of the latest insights into the mechanism of action of strontium in bone / D. Marx, A. Rahimnejad Yazdi, M. Papini, M. Towler // *Bone Reports*. – 2020. – Vol. 12. – P. 100273.

190. Matsuura T. Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium / T. Matsuura, R. Hosokawa, K. Okamoto, T. Kimoto, Y. Akagawa // *Biomaterials*. – 2000. – Vol. 21. – № 11. – P. 1121–1127.

191. McDonald M. M. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption / M. M. McDonald, W. H. Khoo, P. Y. Ng, Y. Xiao, J. Zamerli, P. Thatcher, W. Kyaw, K. Pathmanandavel, A. K. Grootveld, I. Moran, D. Butt, A. Nguyen, A. Corr, S. Warren, M. Biro, N. C. Butterfield, S. E. Guilfoyle, D. Komla-Ebri, M. R. G. Dack, H. F. Dewhurst, J. G. Logan, Y. Li, S. T. Mohanty, N. Byrne, R. L. Terry, M. K. Simic, R. Chai, J. M. W. Quinn, S. E. Youtlen, J. A. Pettitt, D. Abi-Hanna, R. Jain, W. Weninger, M. Lundberg, S. Sun, F. H. Ebetino, P. Timpson, W. M. Lee, P. A. Baldock, M. J. Rogers, R. Brink, G. R. Williams, J. H. D. Bassett, J. P. Kemp, N. J. Pavlos, P. I. Croucher, T. G. Phan // *Cell*. – 2021. – Vol. 184. – № 5. – P. 1330–1347.

192. McNamara L. E. Nanotopographical control of stem cell differentiation / L. E. McNamara, R. J. McMurray, M. J. P. Biggs, F. Kantawong, R. O. C. Oreffo, M. J. Dalby // *Journal of Tissue Engineering*. – 2010. – Vol. 2010. – № 120623.

193. Medici D. The role of endothelial-mesenchymal transition in heterotopic ossification / D. Medici, B. R. Olsen // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 2012. – Vol. 27. – № 8. – P. 1619–1622.

194. Meissner F. Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease / F. Meissner, R. A. Seger, D.

Moshous, A. Fischer, J. Reichenbach, A. Zychlinsky // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – № 9. – P. 1570–1573.

195. Mescher, A. L. *Junqueira's Basic Histology, 15th edition* / Mescher, A. L. – 19. – McGraw Hill Education, 2018. – 562 P.

196. Mevellec J.-Y. Polarized infrared reflectance spectra of brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) crystal investigation of the phosphate stretching modes / J.-Y. Mevellec, S. Quillard, P. Deniard, O. Mekmene, F. Gaucheron, J.-M. Bouler, J.-P. Buisson // *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2013. – Vol. 111. – P. 7–13.

197. Miclăuș T. Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation in vitro / T. Miclăuș, C. Beer, J. Chevallier, C. Scavenius, V. E. Bochenkov, J. J. Enghild, D. S. Sutherland // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 11770.

198. Mikuni-Takagaki Y. Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture / Y. Mikuni-Takagaki, Y. Kakai, M. Satoyoshi, E. Kawano, Y. Suzuki, T. Kawase, S. Saito // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 1995. – Vol. 10. – № 2. – P. 231–242.

199. Millán J. L. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization / J. L. Millán // *Calcified Tissue International*. – 2013. – Vol. 93. – № 4. – P. 299–306.

200. Miller S. C. Bone lining cells: structure and function / S. C. Miller, L. de Saint-Georges, B. M. Bowman, W. S. Jee // *Scanning Microscopy*. – 1989. – Vol. 3. – № 3. – P. 953–960.

201. Miramond T. Osteoinduction of biphasic calcium phosphate scaffolds in a nude mouse model / T. Miramond, P. Corre, P. Borget, F. Moreau, J. Guicheux, G. Daculsi, P. Weiss // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2014. – Vol. 29. – № 4. – P. 595–604.

202. Mizokami A. Osteocalcin and its endocrine functions / A. Mizokami, T. Kawakubo-Yasukochi, M. Hirata // *Biochemical Pharmacology*. – 2017. – Vol. 132. – P. 1–8.

203. Moorehead C. The regulatory effects of proteoglycans on collagen fibrillogenesis and morphology investigated using biomimetic proteoglycans / C. Moorehead, K. Prudnikova, M. Marcolongo // *Journal of Structural Biology*. – 2019. – Vol. 206. – № 2. – P. 204–215.

204. Murakami T. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome / T. Murakami, J. Ockinger, J. Yu, V. Byles, A. McColl, A. M. Hofer, T. Horng // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109. – № 28. – P. 11282–11287.

205. Nair A. K. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone / A. K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang, M. J. Buehler // *Nature Communications*. – 2013. – Vol. 4. – P. 1724.

206. Nakamura M. Characterization of bone mineral-resembling biomaterials for optimizing human osteoclast differentiation and resorption / M. Nakamura, T. Hentunen, J. Salonen, A. Nagai, K. Yamashita // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A.* – 2013. – Vol. 101. – № 11. – P. 3141–3151.

207. Ng G. Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells / G. Ng, K. Sharma, S. M. Ward, M. D. Desrosiers, L. A. Stephens, W. M. Schoel, T. Li, C. A. Lowell, C.-C. Ling, M. W. Amrein, Y. Shi // *Immunity.* – 2008. – Vol. 29. – № 5. – P. 807–818.

208. Nieves J. W. Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals, beyond calcium and vitamin D / J. W. Nieves // *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.* – 2013. – Vol. 24. – № 3. – P. 771–786.

209. Ning L. Porous collagen-hydroxyapatite scaffolds with mesenchymal stem cells for bone regeneration / L. Ning, H. Malmström, Y.-F. Ren // *The Journal of Oral Implantology.* – 2015. – Vol. 41. – № 1. – P. 45–49.

210. Nudelman F. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors / F. Nudelman, K. Pieterse, A. George, P. H. H. Bomans, H. Friedrich, L. J. Brylka, P. A. J. Hilbers, G. de With, N. A. J. M. Sommerdijk // *Nature Materials.* – 2010. – Vol. 9. – № 12. – P. 1004–1009.

211. Nuss K. M. R. Biocompatibility issues with modern implants in bone - a review for clinical orthopedics / K. M. R. Nuss, B. von Rechenberg // *The Open Orthopaedics Journal.* – 2008. – Vol. 2. – P. 66–78.

212. Nymo S. Cholesterol crystal-induced endothelial cell activation is complement-dependent and mediated by TNF / S. Nymo, N. Niyonzima, T. Espevik, T. E. Mollnes // *Immunobiology.* – 2014. – Vol. 219. – № 10. – P. 786–792.

213. Ogle M. E. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design / M. E. Ogle, C. E. Segar, S. Sridhar, E. A. Botchwey // *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.).* – 2016. – Vol. 241. – № 10. – P. 1084–1097.

214. Olszak I. T. Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo / I. T. Olszak, M. C. Poznansky, R. H. Evans, D. Olson, C. Kos, M. R. Pollak, E. M. Brown, D. T. Scadden // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2000. – Vol. 105. – № 9. – P. 1299–1305.

215. Oosterlaken B. M. In Vitro Mineralization of Collagen / B. M. Oosterlaken, M. P. Vena, G. de With // *Advanced Materials* (Deerfield Beach, Fla.). – 2021. – Vol. 33. – № 16.
216. Orgel J. P. R. O. Microfibrillar structure of type I collagen in situ / J. P. R. O. Orgel, T. C. Irving, A. Miller, T. J. Wess // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103. – № 24. – P. 9001–9005.
217. Pan H. Mystery of the transformation from amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite / H. Pan, X. Y. Liu, R. Tang, H. Y. Xu // *Chemical Communications* (Cambridge, England). – 2010. – Vol. 46. – № 39. – P. 7415–7417.
218. Panahifar A. Three-dimensional labeling of newly formed bone using synchrotron radiation barium K-edge subtraction imaging / A. Panahifar, T. M. Swanston, M. Jake Pushie, G. Belev, D. Chapman, L. Weber, D. M. L. Cooper // *Physics in Medicine and Biology*. – 2016. – Vol. 61. – № 13. – P. 5077–5088.
219. Park S.-Y. Extracellular low pH modulates phosphatidylserine-dependent phagocytosis in macrophages by increasing stabilin-1 expression / S.-Y. Park, D.-J. Bae, M.-J. Kim, M. L. Piao, I.-S. Kim // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 14. – P. 11261–11271.
220. Pei D.-D. Contribution of Mitophagy to Cell-Mediated Mineralization: Revisiting a 50-Year-Old Conundrum / D.-D. Pei, J.-L. Sun, C.-H. Zhu, F.-C. Tian, K. Jiao, M. R. Anderson, C. Yiu, C. Huang, C.-X. Jin, B. E. Bergeron, J.-H. Chen, F. R. Tay, L.-N. Niu // *Advanced Science* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany). – 2018. – Vol. 5. – № 10. – P. 1800873.
221. Perez R. A. Injectable collagen/ α -tricalcium phosphate cement: collagen-mineral phase interactions and cell response / R. A. Perez, M.-P. Ginebra // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 2013. – Vol. 24. – № 2. – P. 381–393.
222. Pfeilschifter J. Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta / J. Pfeilschifter, O. Wolf, A. Naumann, H. W. Minne, G. R. Mundy, R. Ziegler // *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. – 1990. – Vol. 5. – № 8. – P. 825–830.
223. Picca A. Cell Death and Inflammation: The Role of Mitochondria in Health and Disease / A. Picca, R. Calvani, H. J. Coelho-Junior, E. Marzetti // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – № 3. – P. 537.
224. Pilmane M. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions / M. Pilmane, K. Salma-Ancane, D. Loca, J. Locs, L. Berzina-Cimdina // *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*. – 2017. – Vol. 78. – P. 1222–1230.

225. Poole K. E. S. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation / K. E. S. Poole, R. L. van Bezooijen, N. Loveridge, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, C. W. Löwik, J. Reeve // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2005. – Vol. 19. – № 13. – P. 1842–1844.
226. Pountos I. The effect of antibiotics on bone healing: current evidence / I. Pountos, T. Georgouli, H. Bird, G. Kontakis, P. V. Giannoudis // *Expert Opinion on Drug Safety*. – 2011. – Vol. 10. – № 6. – P. 935–945.
227. Pupilli F. Design Strategies and Biomimetic Approaches for Calcium Phosphate Scaffolds in Bone Tissue Regeneration / F. Pupilli, A. Ruffini, M. Dapporto, M. Tavoni, A. Tampieri, S. Sprio // *Biomimetics (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 7. – № 3. – P. 112.
228. Qu Y. Bone cements for therapy and regeneration for minimally invasive treatment of neoplastic bone defects / Y. Qu, H. Zhuang, M. Zhang, Y. Wang, D. Zhai, B. Ma, X. Wang, C. Qin, Z. Huan, C. Wu // *Journal of Materials Chemistry. B*. – 2021. – Vol. 9. – № 21. – P. 4355–4364.
229. Querido W. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches / W. Querido, A. L. Rossi, M. Farina // *Micron*. – 2016. – Vol. 80. – P. 122–134.
230. Rada B. NLRP3 inflammasome activation and interleukin-1 β release in macrophages require calcium but are independent of calcium-activated NADPH oxidases / B. Rada, J. J. Park, P. Sil, M. Geiszt, T. L. Leto // *Inflammation Research*. – 2014. – Vol. 63. – № 10. – P. 821–830.
231. Rammelt S. Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites / S. Rammelt, M. Neumann, U. Hanisch, A. Reinstorf, W. Pompe, H. Zwipp, A. Biewener // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2005. – Vol. 73. – № 3. – P. 284–294.
232. Rampado R. Recent Advances in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles and in the Formulation of “Stealthy” Nanomaterials / R. Rampado, S. Crotti, P. Caliceti, S. Pucciarelli, M. Agostini // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – № 166.
233. Ran J. Comparisons among Mg, Zn, Sr, and Si doped nano-hydroxyapatite/chitosan composites for load-bearing bone tissue engineering applications / J. Ran, P. Jiang, G. Sun, Z. Ma, J. Hu, X. Shen, H. Tong // *Mater. Chem. Front.* – 2017. – Vol. 1.
234. Raphel J. Engineered protein coatings to improve the osseointegration of dental and orthopaedic implants / J. Raphel, J. Karlsson, S. Galli, A. Wennerberg, C. Lindsay, M. G. Haugh,

J. Pajarinen, S. B. Goodman, R. Jimbo, M. Andersson, S. C. Heilshorn // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 83. – P. 269–282.

235. Raucci M. G. Injectable Functional Biomaterials for Minimally Invasive Surgery / M. G. Raucci, U. D'Amora, A. Ronca, L. Ambrosio // *Advanced Healthcare Materials*. – 2020. – T. 9. – № 13.

236. Rey C. Bone mineral: update on chemical composition and structure / C. Rey, C. Combes, C. Drouet, M. J. Glimcher // *Osteoporosis international* – 2009. – Vol. 20. – Bone mineral. – № 6. – P. 1013–1021.

237. Reznikov N. Bone hierarchical structure in three dimensions / N. Reznikov, R. Shahar, S. Weiner // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – T. 10. – № 9. – P. 3815–3826.

238. Rico-Llanos G. A. Collagen Type I Biomaterials as Scaffolds for Bone Tissue Engineering / G. A. Rico-Llanos, S. Borrego-González, M. Moncayo-Donoso, J. Becerra, R. Visser // *Polymers*. – 2021. – T. 13. – № 4. – P. 599.

239. Riegger J. Oxidative stress as a key modulator of cell fate decision in osteoarthritis and osteoporosis: a narrative review / J. Riegger, A. Schoppa, L. Ruths, M. Haffner-Luntzer, A. Ignatius // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 2023. – Vol. 28. – № 1. – P. 76.

240. Ripamonti U. Functionalized Surface Geometries Induce: «Bone: Formation by Autoinduction» / U. Ripamonti // *Frontiers in Physiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1084.

241. Ripamonti U. Synergistic induction of bone formation by hOP-1, hTGF-beta3 and inhibition by zoledronate in macroporous coral-derived hydroxyapatites / U. Ripamonti, R. M. Klar, L. F. Renton, C. Ferretti // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – № 25. – P. 6400–6410.

242. Robert A. W. Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach / A. W. Robert, B. H. Marcon, B. Dallagiovanna, P. Shigunov // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – №. 561.

243. Rochefort G. Y. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue / G. Y. Rochefort, S. Pallu, C. L. Benhamou // *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. – 2010. – Vol. 21. – № 9. – P. 1457–1469.

244. Rosa A. L. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography / A. L. Rosa, M. M. Beloti, R. van Noort // *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*. – 2003. – Vol. 19. – № 8. – P. 768–772.

245. Sabido O. Quantitative Flow Cytometric Evaluation of Oxidative Stress and Mitochondrial Impairment in RAW 264.7 Macrophages after Exposure to Pristine, Acid Functionalized, or Annealed Carbon Nanotubes / O. Sabido, A. Figarol, J.-P. Klein, V. Bin, V. Forest, J. Pourchez, B. Fubini, M. Cottier, M. Tomatis, D. Boudard // *Nanomaterials* – 2020. – Vol. 10. – № 2. – P. 319.

246. Saidak Z. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis / Z. Saidak, P. J. Marie // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2012. – Vol. 136. – № 2. – P. 216–226.

247. Salamanca E. Porcine Collagen-Bone Composite Induced Osteoblast Differentiation and Bone Regeneration In Vitro and In Vivo / E. Salamanca, C. C. Hsu, W. L. Yao, C. S. Choy, Y. H. Pan, N.-C. Teng, W.-J. Chang // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12. – № 1. – P. 93.

248. Samavedi S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior / S. Samavedi, A. R. Whittington, A. S. Goldstein. – *Acta Biomater.* – 2013. – Vol. 9 – № 9 – P. 8037-8045.

249. Samstad E. O. Cholesterol crystals induce complement-dependent inflammasome activation and cytokine release / E. O. Samstad, N. Niyonzima, S. Nymo, M. H. Aune, L. Ryan, S. S. Bakke, K. T. Lappegård, O.-L. Brekke, J. D. Lambris, J. K. Damås, E. Latz, T. E. Mollnes, T. Espevik // *Journal of Immunology*. – 2014. – Vol. 192. – № 6. – P. 2837–2845.

250. Sato T. Culture of hybrid spheroids composed of calcium phosphate materials and mesenchymal stem cells on an oxygen-permeable culture device to predict in vivo bone forming capability / T. Sato, T. Anada, R. Hamai, Y. Shiwaku, K. Tsuchiya, S. Sakai, K. Baba, K. Sasaki, O. Suzuki // *Acta Biomaterialia*. – 2019. – Vol. 88. – P. 477–490.

251. Satpathy S. R. Crystalline silica-induced leukotriene B4-dependent inflammation promotes lung tumour growth / S. R. Satpathy, V. R. Jala, S. R. Bodduluri, E. Krishnan, B. Hegde, G. W. Hoyle, M. Fraig, A. D. Luster, B. Haribabu // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 7064.

252. Schaller B. Effects of additional collagen in biphasic calcium phosphates: a study in a rabbit calvaria / B. Schaller, M. Fujioka-Kobayashi, C. Zihlmann, V. C. Schuler, H. Katagiri, N. P. Lang, N. Saulacic // *Clinical Oral Investigations*. – 2020. – Vol. 24. – № 9. – P. 3093–3103.

253. Schemitsch E. H. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! / E. H. Schemitsch // *Journal of Orthopaedic Trauma*. – 2017. – Vol. 31 – № 5 – P. 20–22.

254. Sheikh Z. Mechanisms of in Vivo Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials / Z. Sheikh, M.-N. Abdallah, A. A. Hanafi, S. Misbahuddin, H. Rashid, M. Glogauer // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2015a. – Vol. 8. – № 11. – P. 7913–7925.

255. Sheikh Z. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials / Z. Sheikh, P. J. Brooks, O. Barzilay, N. Fine, M. Glogauer // *Materials*. – 2015b. – Vol. 8. – № 9. – P. 5671–5701.
256. Sheikh Z. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications / Z. Sheikh, S. Najeeb, Z. Khurshid, V. Verma, H. Rashid, M. Glogauer // *Materials (Basel, Switzerland)*. – 2015c. – Vol. 8. – № 9. – P. 5744–5794.
257. Shi G.-X. Evidence of the Role of R-Spondin 1 and Its Receptor Lgr4 in the Transmission of Mechanical Stimuli to Biological Signals for Bone Formation / G.-X. Shi, X.-F. Zheng, C. Zhu, B. Li, Y.-R. Wang, S.-D. Jiang, L.-S. Jiang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017a. – Vol. 18. – № 3. – P. 564.
258. Shi H. Regulating the physicochemical and biological properties in vitro of octacalcium phosphate by substitution with strontium in a large doping range / H. Shi, X. Ye, T. Wu, J. Zhang, J. Ye // *Materials Today Chemistry*. – 2017b. – Vol. 5. – № 2. – P. 81–91.
259. Shih Y.-R. V. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling / Y.-R. V. Shih, Y. Hwang, A. Phadke, H. Kang, N. S. Hwang, E. J. Caro, S. Nguyen, M. Siu, E. A. Theodorakis, N. C. Gianneschi, K. S. Vecchio, S. Chien, O. K. Lee, S. Varghese // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111. – № 3. – P. 990–995.
260. Shiwaku Y. Effect of calcium phosphate phases affecting the crosstalk between osteoblasts and osteoclasts in vitro / Y. Shiwaku, K. Tsuchiya, L. Xiao, O. Suzuki // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2019. – Vol. 107. – № 5. – P. 1001–1013.
261. Shoulders M. D. Collagen structure and stability / M. D. Shoulders, R. T. Raines // *Annual Review of Biochemistry*. – 2009. – Vol. 78. – P. 929–958.
262. Sibilla P. Effects of a hydroxyapatite-based biomaterial on gene expression in osteoblast-like cells / P. Sibilla, A. Sereni, G. Aguiari, M. Banzi, E. Manzati, C. Mischiati, L. Trombelli, L. del Senno // *Journal of Dental Research*. – 2006. – Vol. 85. – № 4. – P. 354–358.
263. Singh A. Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review / A. Singh, G. Gill, H. Kaur, M. Amhmed, H. Jakhu // *Progress in Orthodontics*. – 2018. – T. 19. – № 1. – P. 18.
264. Sodek J. Molecular and cellular biology of alveolar bone / J. Sodek, M. D. McKee // *Periodontology 2000*. – 2000. – Vol. 24. – P. 99–126.
265. Sorushanova A. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development / A. Sorushanova, L. M. Delgado, Z. Wu, N. Shologu, A. Kshirsagar,

R. Raghunath, A. M. Mullen, Y. Bayon, A. Pandit, M. Raghunath, D. I. Zeugolis // *Advanced Materials*. – 2019. – Vol. 31. – № 1.

266. Souza Faloni A. P. de. Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential / A. P. de Souza Faloni, T. Schoenmaker, A. Azari, E. Katchburian, P. S. Cerri, T. J. de Vries, V. Everts // *Calcified Tissue International*. – 2011. – Vol. 88. – № 1. – P. 63–74.

267. Stein G. S. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype / G. S. Stein, J. B. Lian // *Endocrine Reviews*. – 1993. – Vol. 14. – № 4. – P. 424–442.

268. Stewart C. R. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer / C. R. Stewart, L. M. Stuart, K. Wilkinson, J. M. van Gils, J. Deng, A. Halle, K. J. Rayner, L. Boyer, R. Zhong, W. A. Frazier, A. Lacy-Hulbert, J. El Khoury, D. T. Golenbock, K. J. Moore // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11. – № 2. – P. 155–161.

269. Stipniece L. Strontium substituted hydroxyapatite promotes direct primary human osteoblast maturation / L. Stipniece, S. Wilson, J. M. Curran, R. Chen, K. Salma-Ancane, P. K. Sharma, B. J. Meenan, A. R. Boyd // *Ceramics International*. – 2021. – Vol. 47. – № 3. – P. 3368–3379.

270. Subbiah R. Engineering of an Osteoinductive and Growth Factor-Free Injectable Bone-Like Microgel for Bone Regeneration / R. Subbiah, E. Y. Lin, A. Athirasala, G. E. Romanowicz, A. S. P. Lin, J. V. Califano, R. E. Guldborg, L. E. Bertassoni // *Advanced Healthcare Materials*. – 2023. – Vol. 12. – № 11.

271. Suzuki O. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite / O. Suzuki, S. Kamakura, T. Katagiri, M. Nakamura, B. Zhao, Y. Honda, R. Kamijo // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27. – № 13. – P. 2671–2681.

272. O. Octacalcium phosphate: osteoconductivity and crystal chemistry / O. Suzuki // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6. – № 9. – P. 3379–3387.

273. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders / R. Swaminathan // *The Clinical Biochemist. Reviews*. – 2003. – Vol. 24. – № 2. – P. 47–66.

274. Takami M. Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts / M. Takami, A. Mochizuki, A. Yamada, K. Tachi, B. Zhao, Y. Miyamoto, T. Anada, Y. Honda, T. Inoue, M. Nakamura, O. Suzuki, R. Kamijo // *Tissue Engineering. Part A*. – 2009. – Vol. 15. – № 12. – P. 3991–4000.

275. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems / H. Takayanagi // *Nature Reviews. Immunology.* – 2007. – Vol. 7. – Osteoimmunology. – № 4. – P. 292–304.

276. Tang C. Biomaterial Precursor Formation Is Initiated by Transporting Calcium and Phosphorus Clusters from the Endoplasmic Reticulum to Mitochondria / C. Tang, Y. Wei, L. Gu, Q. Zhang, M. Li, G. Yuan, Y. He, L. Huang, Y. Liu, Y. Zhang // *Advanced Science* (. – 2020. – Vol. 7. – № 8. – P. 1902536.

277. Tang Z. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics / Z. Tang, X. Li, Y. Tan, H. Fan, X. Zhang // *Regenerative Biomaterials.* – 2018. – T. 5. – № 1. – P. 43–59.

278. Tang Z. Bone morphogenetic protein Smads signaling in mesenchymal stem cells affected by osteoinductive calcium phosphate ceramics / Z. Tang, Z. Wang, F. Qing, Y. Ni, Y. Fan, Y. Tan, X. Zhang // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A.* – 2015. – Vol. 103. – № 3. – P. 1001–1010.

279. Termine J. D. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen / J. D. Termine, H. K. Kleinman, S. W. Whitson, K. M. Conn, M. L. McGarvey, G. R. Martin // *Cell.* – 1981. – Vol. 26. – № 1. – P. 99–105.

280. Teterina A. Yu. Injectable Hydrated Calcium Phosphate Bone-like Paste: Synthesis, In Vitro, and In Vivo Biocompatibility Assessment / A. Yu. Teterina, V. V. Minaychev, P. V. Smirnova, M. I. Kobiakova, I. V. Smirnov, R. S. Fadeev, A. A. Egorov, A. A. Ashmarin, K. V. Pyatina, A. S. Senotov, I. S. Fadeeva, V. S. Komlev. // *Technologies.* – Vol. 11. – № 77.

281. Teterina A. Y. Octacalcium Phosphate for Bone Tissue Engineering: Synthesis, Modification, and In Vitro Biocompatibility Assessment / A. Y. Teterina, I. V. Smirnov, I. S. Fadeeva, R. S. Fadeev, P. V. Smirnova, V. V. Minaychev, M. I. Kobyakova, A. Y. Fedotov, S. M. Barinov, V. S. Komlev // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2021. – Vol. 22. – № 23. – P. 12747.

282. Tokuyama T. Mitochondrial Dynamics Regulation in Skin Fibroblasts from Mitochondrial Disease Patients / T. Tokuyama, A. Hirai, I. Shiiba, N. Ito, K. Matsuno, K. Takeda, K. Saito, K. Mii, N. Matsushita, T. Fukuda, R. Inatome, S. Yanagi // *Biomolecules.* – 2020. – Vol. 10. – № 3.

283. Toledano M. Differential Biodegradation Kinetics of Collagen Membranes for Bone Regeneration / M. Toledano, S. Asady, M. Toledano-Osorio, F. García-Godoy, M.-A. Serrera-Figallo, J. A. Benítez-García, R. Osorio // *Polymers.* – 2020. – Vol. 12. – № 6. – P. 1290.

284. Urist M. R. Bone morphogenetic protein / M. R. Urist, B. S. Strates // *Journal of Dental Research*. – 1971. – Vol. 50. – № 6. – P. 1392–1406.
285. Velard F. Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: an overview / F. Velard, J. Braux, J. Amedee, P. Laquerriere // *Acta Biomaterialia*. – 2013. – Vol. 9. – № 2. – P. 4956–4963.
286. Velard F. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction / F. Velard, D. Laurent-Maquin, C. Guillaume, S. Bouthors, E. Jallot, J.-M. Nedelec, A. Belaaouaj, P. Laquerriere // *Acta Biomaterialia*. – 2009. – Vol. 5. – № 5. – P. 1708–1715.
287. Viti F. Osteogenic Differentiation of MSC through Calcium Signaling Activation: Transcriptomics and Functional Analysis / F. Viti, M. Landini, A. Mezzelani, L. Petecchia, L. Milanese, S. Scaglione // *PloS One*. – 2016. – Vol. 11. – № 2.
288. Wagner D. O. Where did bone come from? / D. O. Wagner, P. Aspenberg // *Acta Orthopaedica*. – 2011. – Vol. 82. – № 4. – P. 393–398.
289. Wan B. Building Osteogenic Microenvironments With Strontium-Substituted Calcium Phosphate Ceramics / B. Wan, R. Wang, Y. Sun, J. Cao, H. Wang, J. Guo, D. Chen // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 591467.
290. Wang F. Lysosomal membrane permeabilization and cell death / F. Wang, R. Gómez-Sintes, P. Boya // *Traffic*. – 2018. – Vol. 19. – № 12. – P. 918–931.
291. Wang J. Effect of phase composition on protein adsorption and osteoinduction of porous calcium phosphate ceramics in mice / J. Wang, Y. Chen, X. Zhu, T. Yuan, Y. Tan, Y. Fan, X. Zhang // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2014a. – Vol. 102. – № 12. – P. 4234–4243.
292. Wang J. Role of biphasic calcium phosphate ceramic-mediated secretion of signaling molecules by macrophages in migration and osteoblastic differentiation of MSCs / J. Wang, D. Liu, B. Guo, X. Yang, X. Chen, X. Zhu, Y. Fan, X. Zhang // *Acta Biomaterialia*. – 2017. – Vol. 51. – P. 447–460.
293. Wang L. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution / L. Wang, G. H. Nancollas // *Chemical Reviews*. – 2008. – Vol. 108. – № 11. – P. 4628–4669.
294. Wang P. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells / P. Wang, L. Zhao, J. Liu, M. D. Weir, X. Zhou, H. H. K. Xu // *Bone Research*. – 2014b. – Vol. 2. – P. 14017.
295. Wang Y. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite / Y. Wang, T. Azais, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriél, G.

Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, N. Nassif // *Nature Materials*. – 2012. – Vol. 11. – № 8. – P. 724–733.

296. Wei Q. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials / Q. Wei, T. Becherer, S. Angioletti-Uberti, J. Dzubiella, C. Wischke, A. T. Neffe, A. Lendlein, M. Ballauff, R. Haag // *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. – 2014. – Vol. 53. – № 31. – P. 8004–8031.

297. Wei X.-F. Wnt and BMP signaling pathways co-operatively induce the differentiation of multiple myeloma mesenchymal stem cells into osteoblasts by upregulating EMX2 / X.-F. Wei, Q.-L. Chen, Y. Fu, Q.-K. Zhang // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2019. – Vol. 120. – № 4. – P. 6515–6527.

298. Wen L. Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health (Review) / L. Wen, J. Chen, L. Duan, S. Li // *Molecular Medicine Reports*. – 2018. – Vol. 18. – № 1. – P. 3–15.

299. Wu L. N. Y. Analysis and molecular modeling of the formation, structure, and activity of the phosphatidylserine-calcium-phosphate complex associated with biomineralization / L. N. Y. Wu, B. R. Genge, R. E. Wuthier // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 7. – P. 3827–3838.

300. Wuthier R. E. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification / R. E. Wuthier, G. F. Lipscomb // *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. – 2011. – Vol. 16. – № 8. – P. 2812–2902.

301. Xia L. Enhanced osteogenesis through nano-structured surface design of macroporous hydroxyapatite bioceramic scaffolds via activation of ERK and p38 MAPK signaling pathways / L. Xia, K. Lin, X. Jiang, Y. Xu, M. Zhang, J. Chang, Z. Zhang // *Journal of Materials Chemistry. B*. – 2013. – Vol. 1. – № 40. – P. 5403–5416.

302. Xia Z. A review on macrophage responses to biomaterials / Z. Xia, J. T. Triffitt // *Biomedical Materials (Bristol, England)*. – 2006. – Vol. 1. – № 1. – P. 1-9.

303. Yadav M. C. Skeletal Mineralization Deficits and Impaired Biogenesis and Function of Chondrocyte-Derived Matrix Vesicles in Phospho1(-/-) and Phospho1/Pi t1 Double-Knockout Mice / M. C. Yadav, M. Bottini, E. Cory, K. Bhattacharya, P. Kuss, S. Narisawa, R. L. Sah, L. Beck, B. Fadeel, C. Farquharson, J. L. Millán // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2016. – Vol. 31. – № 6. – P. 1275–1286.

304. Yalin S. Strontium ranelate treatment improves oxidative damage in osteoporotic rat model / S. Yalin, O. Sagır, U. Comelekoglu, M. Berköz, P. Eroglu // *Pharmacological reports: PR*. – 2012. – Vol. 64. – № 2. – P. 396–402.

305. Yim E. K. F. Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage / E. K. F. Yim, S. W. Pang, K. W. Leong // *Experimental Cell Research*. – 2007. – Vol. 313. – № 9. – P. 1820–1829.
306. You J. Strontium Functionalized in Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Prominent Role in Osteoimmunomodulation / J. You, Y. Zhang, Y. Zhou // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 10. – № 928799.
307. Yu L. Biomineralization of Collagen-Based Materials for Hard Tissue Repair / L. Yu, M. Wei // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 2. – P. 944.
308. Yuan F.-L. Apoptotic bodies from endplate chondrocytes enhance the oxidative stress-induced mineralization by regulating PPI metabolism / F.-L. Yuan, R.-S. Xu, J.-X. Ye, M.-D. Zhao, L.-J. Ren, X. Li // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2019. – Vol. 23. – № 5. – P. 3665–3675.
309. Yuan H. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP / H. Yuan, J. D. De Bruijn, Y. Li, J. Feng, Z. Yang, K. De Groot, X. Zhang // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 2001. – Vol. 12. – № 1. – P. 7–13.
310. Yuan H. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats / H. Yuan, M. Van Den Doel, S. Li, C. A. Van Blitterswijk, K. De Groot, J. D. De Bruijn // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 2002. – Vol. 13. – № 12. – P. 1271–1275.
311. Yuan H. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials / H. Yuan, Z. Yang, Y. Li, X. Zhang, J. D. De Bruijn, K. De Groot // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 1998a. – Vol. 9. – № 12. – P. 723–726.
312. Yuan H. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis / H. Yuan, P. Zou, Z. Yang, X. Zhang, J. D. De Bruijn, K. De Groot // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 1998b. – Vol. 9. – № 12. – P. 717–721.
313. Yuan X. Immunomodulatory Effects of Calcium and Strontium Co-Doped Titanium Oxides on Osteogenesis / X. Yuan, H. Cao, J. Wang, K. Tang, B. Li, Y. Zhao, M. Cheng, H. Qin, X. Liu, X. Zhang // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1196.
314. Wang Z. Applications of calcium phosphate nanoparticles in porous hard tissue engineering scaffolds / Z. Wang, Z. Tang, Q. Fangzhu, H. Youliang, Z. Xingdong // *Nano*. – 2012. – Vol. 07. – № 4.
315. Williams D. F. On the mechanisms of biocompatibility / D. F. Williams // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29. – № 20. – P. 2941–2953.

316. Zarkovic N. Roles and Functions of ROS and RNS in Cellular Physiology and Pathology / N. Zarkovic // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – № 3. – P. 767.
317. Zeimaran E. Advances in bioactive glass-containing injectable hydrogel biomaterials for tissue regeneration / E. Zeimaran, S. Pourshahrestani, A. Fathi, N. A. B. A. Razak, N. A. Kadri, A. Sheikhi, F. Baino // *Acta Biomaterialia*. – 2021. – Vol. 136. – P. 1–36.
318. Zelenchuk L. V. Age dependent regulation of bone-mass and renal function by the MEPE ASARM-motif / L. V. Zelenchuk, A.-M. Hedge, P. S. N. Rowe // *Bone*. – 2015. – Vol. 79. – P. 131–142.
319. Zhang L.-Y. Recent Advances in Biomaterials for the Treatment of Bone Defects / L.-Y. Zhang, Q. Bi, C. Zhao, J.-Y. Chen, M.-H. Cai, X.-Y. Chen // *Organogenesis*. – 2020. – Vol. 16. – № 4. – P. 113–125.
320. Zhong Z. Zn/Sr dual ions-collagen co-assembly hydroxyapatite enhances bone regeneration through procedural osteo-immunomodulation and osteogenesis / Z. Zhong, X. Wu, Y. Wang, M. Li, Y. Li, X. Liu, X. Zhang, Z. Lan, J. Wang, Y. Du, S. Zhang // *Bioactive Materials*. – 2022. – Vol. 10. – P. 195–206.
321. Zhou C. Antiadipogenesis and Osseointegration of Strontium-Doped Implant Surfaces / C. Zhou, Y. Q. Chen, Y. H. Zhu, G. F. Lin, L. F. Zhang, X. C. Liu, F. M. He // *Journal of Dental Research*. – 2019. – Vol. 98. – № 7. – P. 795–802.
322. Zhu X. D. Effect of surface structure on protein adsorption to biphasic calcium-phosphate ceramics in vitro and in vivo / X. D. Zhu, H. S. Fan, Y. M. Xiao, D. X. Li, H. J. Zhang, T. Luxbacher, X. D. Zhang // *Acta Biomaterialia*. – 2009. – Vol. 5. – № 4. – P. 1311–1318.
323. Zhu X. D. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption / X. D. Zhu, H. J. Zhang, H. S. Fan, W. Li, X. D. Zhang // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6. – № 4. – P. 1536–1541.
324. Zimmermann E. A. Bone as a Structural Material / E. A. Zimmermann, R. O. Ritchie // *Advanced Healthcare Materials*. – 2015. – Vol. 4. – № 9. – P. 1287–1304.

БЛАГОДАРНОСТИ

Искренне выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю к.б.н. Фадеевой Ирине Сергеевне за ее мудрое руководство, ценные советы, помощь и поддержку в процессе выполнения и написания диссертационной работы. Также хочу выразить искреннюю признательность д.ф.-м.н. Акатову Владимиру Семеновичу, к.б.н. Фадееву Роману Сергеевичу и к.б.н. Сенотову Анатолию Сергеевичу за их ценные советы и поддержку на протяжении всего исследования.

Я признателен сотрудникам Лаборатории керамических композиционных материалов Института металлургии и материаловедения им. А. А. Байкова РАН к.т.н. Тетериной Анастасии Юрьевне, Смирнову Игорю Валерьевичу и Смирновой Полине Викторовне за их бесценный вклад в проведенную работу и многолетнее плодотворное сотрудничество.

Отдельное спасибо д.м.н. Маевскому Евгению Ильичу, д.х.н. Шляпникову Юрию Михайловичу и д.б.н. Севастьянову Виктору Ивановичу за их заинтересованность в моей работе, ценные советы и рекомендации.

Желаю выразить благодарность своим дорогим коллегам – Пятиной Кире Вадимовне, к.б.н. Гончарову Руслану Георгиевичу, к.б.н. Кобяковой Маргарите Игоревне, к.б.н. Ломовскому Алексею Игоревичу, Краснову Кириллу Сергеевичу, Ломовской Яне Владимировне и Звягиной Алёне Игоревне за постоянный интерес к работе и моральную поддержку. За годы нашей совместной учебы и работы мы не только стали отличными коллегами, но и настоящими друзьями.

Также хочу сказать большое спасибо всему коллективу Лабораторий Биомедицинских технологий, Тканевой инженерии и фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН за их всестороннюю поддержку, помощь в проведении экспериментов и создание благоприятной рабочей атмосферы.