

УДК 616.71-001.5-003.93-089.819.843:611.018.4.08

DOI: 10.34215/1609-1175-2021-2-31-36

Биоактивные покрытия на металлических сплавах и стимуляция восстановления кости после перелома

Р.Е. Костив, Н.Ю. Матвеева, С.Г. Калиниченко

Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

Представлен обзор данных литературы и собственных исследований авторов по молекулярно-клеточным механизмам остеиндуктивных эффектов кальций-фосфатных соединений и их значению при сращении переломов. Применение титановых имплантатов с кальций-фосфатными и гидроксиапатитными покрытиями ведет к структурным преобразованиям костной ткани в межотломковой щели и активизации репаративных процессов. Эти события коррелируют с изменением экспрессии морфогенетических и апоптотических факторов на разных стадиях репаративного остеогенеза. Репаративный эффект кальций-фосфатных соединений можно оценить как сумму камбиальной активности CD44-реактивных мезенхимальных стволовых клеток и вторичного распространения повреждения – апоптоза клеток костного регенерата. Взаимосвязь этих процессов на каждом из этапов сращения перелома обеспечивают костные морфогенетические белки, сосудистый эндотелиальный фактор роста и трансформирующий фактор роста- β . Обсуждаются проблемные вопросы применения металлических сплавов с биорезорбируемыми покрытиями в лечении переломов длинных трубчатых костей.

Ключевые слова: репаративный остеогенез, костные морфогенетические белки, мезенхимальные стволовые клетки, остеиндукция, апоптоз

Поступила в редакцию 26.03.2021. Принята к печати 09.04.2021

Для цитирования: Костив Р.Е., Матвеева Н.Ю., Калиниченко С.Г. Биоактивные покрытия на металлических сплавах и стимуляция восстановления кости после перелома. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2021;2:31–6. doi: 10.34215/1609-1175-2021-2-31-36

Для корреспонденции: Матвеева Наталья Юрьевна – д-р мед. наук, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ТГМУ (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2); ORCID: 0000-0003-0844-7950; e-mail: nymatveeva@mail.ru

Bioactive coatings on metallic alloys and stimulation of bone repair after fracture

R.Ye. Kostiv, N.Yu. Matveeva, S.G. Kalinichenko

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Summary: The survey of the literature data and authors' research on molecular-cell mechanisms of the osteoinductive effect of calcium-phosphate compounds and their importance during fracture healing. The usage of titanium implants containing calcium-phosphate and hydroxyapatite covering leads to structural transformation of the bony tissue in the interstitial gap and activation of the reparative processes. These activities correlate with the changes in expression of morphogenetic and apoptotic factors in different stages of the reparative osteogenesis. Reparative effect of the calcium-phosphate compounds can be estimated as a sum of cambial activity CD44-reactive mesenchymal stem cells and secondary fracture spread – the apoptosis of the cells of bone regenerate. The interaction of these processes in each stage of bone healing provides bone morphogenetic proteins, vascular endothelial growth factor and transformative growth-factor- β . Current issues of the metal alloy with bioresorbable covering for the long bones healing are discussed.

Keywords: reparative osteogenesis, bone morphogenetic proteins, mesenchymal stem cells, osteoinduction, apoptosis

Received 26 March 2021; Accepted 9 April 2021

For citation: Kostiv RYe, Matveeva NYu, Kalinichenko SG. Bioactive coatings on metallic alloys and stimulation of bone repair after fracture. *Pacific Medical Journal*. 2021;2:31–6. doi: 10.34215/1609-1175-2021-2-31-36

Corresponding author: Natalya Yu. Matveeva, MD, PhD, head of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Pacific State Medical University, (2 Ostryakova Ave., Vladivostok, 690002, Russian Federation); ORCID: 0000-0003-0844-7950; e-mail: nymatveeva@mail.ru

Костная ткань представляет собой сложную полифункциональную систему, которую формируют три типа остеогенизирующих клеток: остеобласты, остециты и остеокласты. Непрерывное обновление этих популяций обеспечивают мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки, наделяющие кость способностью к активным пластическим перестройкам в процессах физиологической и репаративной регенерации [1]. Заживление перелома кости повторяет основные этапы эмбрионального гистогенеза. Этот фундаментальный

репаративный принцип воплощается благодаря единому механизму молекулярно-клеточной регуляции [2]. Из-за неполной стабильности костных отломков большинство переломов подвергается непрямому или вторичному заживлению, что ведет к смешанному внутримембранозному и эндохондральному окостенению и последующему образованию костной мозоли. Перечисленные события инициируют образование новой кости непосредственно под надкостницей в течение первых дней после травмы.

Хемотаксический сигнал для остеопрогениторов формируют многочисленные факторы роста и основные из них – костные морфогенетические белки (bone morphogenetic proteins, BMPs), сосудистый эндотелиальный фактор роста и трансформирующий фактор роста- β (transforming growth factor beta, TGF- β) [3, 4]. На ранней стадии репарации вокруг поврежденной надкостницы вначале активируются BMPs 2, 4 и 7, которые поддерживают временную стабилизацию клеток в межотломковом пространстве с дальнейшим формированием мягкой костной мозоли [5]. BMP-2 направляет дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в сторону хондробластов и остеобластов уже через 24 часа после повреждения кости [6]. Другие типы BMPs экспрессируются на стадии кальцификации и резорбции хряща и в основном стимулируют последующее созревание остеобластов. Оссификация костного регенерата нуждается в адекватном сосудистом окружении. Синхронизацию этого процесса с ангиогенезом опосредует сосудистый эндотелиальный фактор роста, который особенно активен на поздней стадии заживления и ремоделирования мягкой мозоли [7]. TGF- β формирует своеобразный молекулярный «мостик», интегрирующий согласованное развитие всех элементов костного регенерата и последовательную смену этапов оссификации [8].

Сращение перелома – чрезвычайно пластичный процесс. Планиметрический рост новой кости зависит от множества факторов: от уровня механической нагрузки и надлежащей стабилизации отломков до эндогенных молекулярных влияний и состояния ближайшего микроокружения [9]. Не всегда эти факторы оказывает позитивное действие на остеогенез. Поэтому особый интерес приобретают исследования остеоиндуктивных, остеогенных и остеокондуктивных материалов, перспективных в плане экзогенной регуляции репаративной перестройки костной ткани [10]. Остеокондуктивные препараты выполняют роль имплантируемого трофического каркаса для растущей кости, а остеоиндуктивные молекулы реорганизуют костную ткань, вызывая пролиферацию и дифференцировку всех ее клеток [11–13].

Мы исследовали молекулярно-клеточные механизмы восстановления моделируемого перелома бедренной кости у крыс при установке титановых имплантатов с кальций-фосфатным и гидроксиапатитным покрытием. Данные покрытия, изготовленные с помощью плазменного электролитического оксидирования, имеют наноструктурные характеристики близкие химическому составу и пористости костной ткани человека и проявляют биорезорбируемые и остеоиндуктивные свойства [14–16].

В эксперименте видимые репаративные изменения кости в участке перелома обнаруживались на 7-й день. У контрольных животных с имплантатом без биоактивного покрытия в непосредственной близости от перелома толщина надкостницы увеличивалась

примерно до 200 мкм. Под надкостницей параллельными слоями располагалась грубоволокнистая ткань. В ее составе имеются отдельные хаотично переплетенные коллагеновые волокна, напоминавшие неоформленную соединительную ткань. Между волокнами хорошо заметны крупные базофильные клетки до 20 мкм в поперечнике с морфологическими признаками остеобластов. Четко выраженные костные пластины появлялись к 14-му дню после перелома, и к 30-му дню пластинчатая костная ткань становилась преобладающей. Система новообразованных остеонов появлялась на 14-е сутки. В непосредственной близости от места перелома формировались остеоны диаметром около 90 мкм. Их формировали два-три слоя костных пластинок, окружающих широкий гаверсов канал. Морфологические изменения в зоне контакта имплантата с кальций-фосфатным и гидроксиапатитным покрытием и кости указывали на активизацию репаративных процессов. Об этом свидетельствовали выраженный аппозиционный рост ниже волокнистого слоя периоста, многочисленные линии склеивания, указывавшие на процессы резорбции и новообразование костного вещества, пролиферирующие остеобласты.

Репаративный остеогенез в зоне перелома характеризовался неизменным увеличением количества остеобластов, микрососудов и волокнистых структур, которые дополняли отложение аморфного вещества и последующую импрегнацию ткани солями кальция. В контрольной группе крыс неоангиогенез и увеличение пула остеобластов отмечалось ниже волокнистого слоя надкостницы в первую неделю эксперимента. На 14-й день регистрировался пик формирования твердой мозоли. Появляются многочисленные остеокласты и линии склеивания, указывающие на процессы резорбции и новообразования костного вещества. На 30-й день эксперимента выявлялась полностью сформированная гаверсова система, которую пенировала сеть хорошо развитых сосудов. Изменения поврежденной кости у животных с имплантируемым материалом продемонстрировали значимое увеличение интенсивности регенераторного процесса с заметным приростом числа сосудов и остеобластов на поверхности биоактивных покрытий.

Данные по динамике обновления клеточных популяций на кальций-фосфатных и гидроксиапатитных покрытиях дополняются результатами исследования иммунореактивных морфогенетических белков (рис. 1). Экспрессия BMP-2 была особо активна на ранней стадии сращения перелома вокруг поврежденной надкостницы. Однако на 14-й и 30-й дни эксперимента мы наблюдали умеренную BMP-2-иммунореактивность во всех отделах костного регенерата: в области периоста, между концами отломков и со стороны эндоста. Около имплантатов с биоактивными покрытиями установлена повышенная экспрессия сосудистого эндотелиального фактора роста в субпопуляции остеобластов, находящихся в зоне регенерации перелома, которая

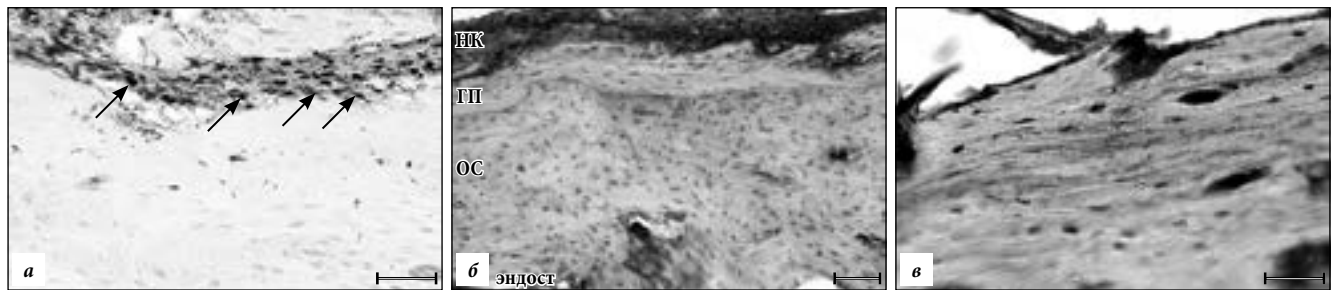


Рис. 1. Иммунореактивные клетки костной ткани у крыс при моделировании перелома с установкой имплантата с биоактивным покрытием:

а – BMP-2-позитивные остеобласты (стрелки) надкостницы на 30-е сутки эксперимента; *б* – усиление экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста в клетках надкостницы (НК), умеренная и низкая реактивность наблюдается в остеобластах и фибробластоподобных клетках остеонного слоя (ОС), в слое наружных генеральных пластинок (ГП) и в области эндоста на 14-е сутки эксперимента (препарат докрашен гематоксилином); *в* – TGF-β2-позитивные клетки в области наружных генеральных пластинок, примыкающих к внутреннему слою надкостницы, на 7-е сутки эксперимента. Иммуногистохимия. Масштаб: *а* – 150 мкм, *б*, *в* – 100 мкм.

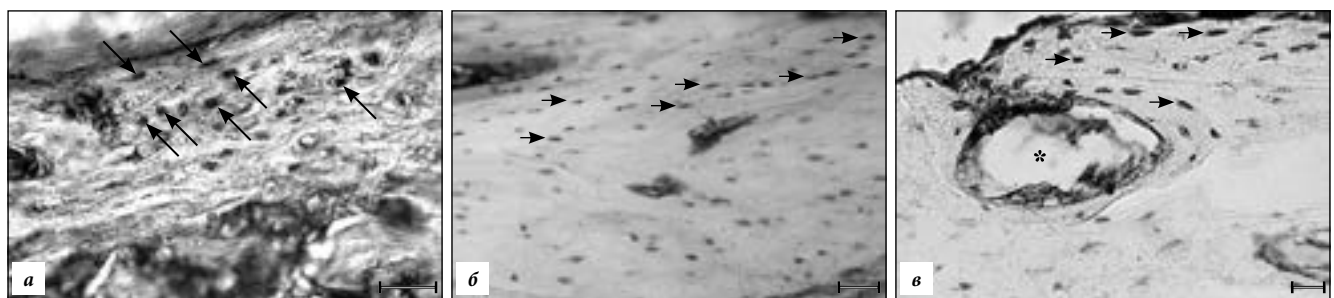


Рис. 2. Фактор дифференцировки и апоптотические факторы в костной ткани крысы при моделировании перелома с установкой имплантата с биоактивным покрытием (14-й день эксперимента):

а – гиперэкспрессия CD44 в остеобластах костных пластинок под внутренним слоем надкостницы (стрелки); *б* – p53-иммунореактивные клетки (стрелки) в остеобластах наружных генеральных пластинок под надкостницей; *в* – экспрессия каспазы-3 в остеоцитах (стрелки) растущих остеонов и в выстилке гаверсовых каналов (звездочка). Иммуногистохимия. Масштаб: *а*, *б* – 100 мкм, *в* – 50 мкм.

сочеталась с понижением активности TGF-β2 в хондробластах в первые две недели после операции [17].

Таким образом, остеоиндуктивный эффект кальций-фосфатных и гидросиапатитных покрытий заключается в стимуляции экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста и BMP-2 в соединительнотканых элементах кости, главным образом в остеобластах, капиллярах и адвентициальных клетках. Это явление синхронизировано с изменением иммунолокализации TGF-β2, интенсивность продукции которого заметно снижалась в хондробластах в течение двух недель после установки имплантата с кальций-фосфатным покрытием. В этих условиях экспрессия TGF-β2 заметно увеличивалась только в поздние периоды репарации кости. Как известно, каждый из морфогенетических белков включает специфические сигнальные мессенджеры и регулирует определенные стадии остеогенеза [18, 19]. Молекулярный полиморфизм белков может при определенных условиях менять их синергичные эффекты на противоположные. Можно полагать, что эта функциональная гетерогенность проявляется и в неоднозначном регуляторном действии кальций-фосфатных покрытий.

С какой стороны ни рассматривать происхождение эффектов биоактивных соединений, можно прийти к убеждению, что репарация перелома обусловлена смещением баланса гибели и пролиферации

остеогенных клеток. Выражением этого баланса служит апоптотический и пролиферативный индекс, который фиксируется по распределению апоптотических и антиапоптотических факторов, соответственно [20]. Апоптоз реализуется с помощью внутриклеточных каспаз 3 и 9. Его запускают специальные факторы p53 и p21, повреждающие митохондрии и мембраны эндоплазматической сети [21, 22]. Апоптоз также вызывает активация «рецепторов смерти» на клеточной поверхности, например, рецепторов нейротрофинов и суперсемейства фактора некроза опухоли [23]. Этим воздействиям противостоят белки Mdm2 и Bcl-2, которые инактивируют проапоптотические молекулы [24]. Апоптоз определяет размер популяции остеогенных клеток и считается неотъемлемой частью физиологического обновления, восстановления и регенерации костей. Хотя апоптоз здесь идентифицирован во многих исследованиях, остается открытым вопрос о механизмах его избирательной регуляции посредством экспрессии ростовых и морфогенетических молекул в разных категориях клеток кости [23, 25].

Мы провели сравнительное исследование про- и антиапоптотических факторов, а также маркеров остеобластического пула при экспериментальном переломе (рис. 2). Абсолютное большинство клеток, позитивных на ядерный антиген пролиферирующих клеток, остеокальцин и молекулу клеточной адгезии CD44,

и регуляторных факторов в условиях репаративного остеогенеза. В центре этой концепции находится влияние морфогенетических молекул на избирательные популяции клеток костного регенерата. Аппликация кальций-фосфатных соединений регулирует баланс пролиферативных и апоптотических процессов, компенсируя цитодеструктивные последствия на каждом этапе сращения перелома.

Использование биоактивных покрытий в восстановлении перелома находит не только весомое экспериментальное обоснование. Изучение апоптоза и его функциональной регуляции может способствовать разработке терапевтических средств для контроля клеточного и метаболического гомеостаза костной ткани у пациентов с остеопорозом и другими заболеваниями опорно-двигательного аппарата [36, 37]. Некоторые ростовые молекулы можно синтезировать *in vitro* с помощью технологии рекомбинантных ДНК микроорганизмов [38]. Эти методы успешно освоены в промышленном производстве BMPs, однако применение их в клинической практике имеет целый ряд существенных ограничений [39]. В частности, получение подобных соединений с использованием прокариотов делает невозможным гликозилирование молекул полипептида, поэтому их посттрансляционное созревание остается незавершенным [40]. Из-за этого снижается биодоступность препаратов, при введении в организм они становятся менее устойчивы к ингибиторам и действию эндогенных протеаз. Такие пептиды также легко денатурируются при создании лекарственной формы. Кроме того, для достижения значимого фармакологического эффекта требуются большие дозировки BMPs, в сотни раз превышающие физиологические уровни. Это увеличивает риск нежелательных побочных эффектов.

Таким образом, биорезорбируемые кальций-фосфатные и гидроксиапатитные покрытия на металлических сплавах стимулируют остеобластический дифферон опосредовано через ростовые факторы и представляют альтернативную систему в лечении переломов.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: научное исследование выполнено при финансовой поддержке грантов ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России.

Литература / References

1. Паюшина О.В., Старостин В.И., Хрущов Н.Г. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки: характеристика, потенции к дифференцировке и перспективы клинического использования. *Биология стволовых клеток и клеточные технологии*. М.: Медицина, 2009; Т.2:100–23. [Payushina OV, Starostin VI, Hrushchov NG. Multipotentnye mezenhimnye stromalnye kletki: harakteristika, potencii k differencirovke i perspektivy klinicheskogo ispolzovaniya. *Biologiya stvolovykh kletok i kletochnye tekhnologii*. Moscow: Medicina; 2009; Vol. 2:100–23 (In Russ).]
2. Toosi S, Behravan J. Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides. *Biofactors*. 2020;46(3):326–40.
3. Clarkin CE, Gerstenfeld LC. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication? *Cell Biochem Func*. 2013;31:1–11.
4. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Haithcock DA, Cundiff CA, Schwartz Z, Boyan BD. Coordinated regulation of mesenchymal stem cell differentiation on microstructured titanium surfaces by endogenous bone morphogenetic proteins. *Bone*. 2015;73:208–16.
5. Bolander J, Chai YC, Geris L, Schrooten J, Lambrechts D, Roberts SJ, Luyten FP. Early BMP, Wnt and Ca(2+)/PKC pathway activation predicts the bone forming capacity of periosteal cells in combination with calcium phosphates. *Biomaterials*. 2016;86:106–18.
6. Shirakura M, Kram V, Robinson J, Sikka S, Kilts TM, Wadhwa S, Young MF. Extracellular matrix mediates BMP-2 in a model of temporomandibular joint osteoarthritis. *Cells Tissues Organs*. 2017;204(2):84–92.
7. Matsubara H, Hogan DE, Morgan EF, Mortlock DP, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Vascular tissues are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis. *Bone*. 2012;51:168–80.
8. Dole NS, Mazur CM, Acevedo C, Lopez JP, Monteiro DA, Fowler TW, et al. Osteocyte-intrinsic TGF- β signaling regulates bone quality through perilacunar/canalicular remodeling. *Cell Rep*. 2017;21(9):2585–96.
9. Balmayor ER. Targeted delivery as key for the success of small osteoinductive molecules. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;94:13–27.
10. Li D, Zhang K, Shi C, Liu L, Yan G, Liu C, et al. Small molecules modified biomimetic gelatin/hydroxyapatite nanofibers constructing an ideal osteogenic microenvironment with significantly enhanced cranial bone formation. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:7167–81.
11. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001;10(Suppl 2):S96–101.
12. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015;81:112–21.
13. Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J*. 2016;98-B(1 Suppl A):6–9.
14. Гнезденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синебрюхов С.Л., Хрисанфова О.А., Легостаева Е.В., Завидная А.Г. и др. Функциональные покрытия для имплантационных материалов. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2012;1:12–9. [Gnezdenkov SV, Sharkeev YuP, Sinebryukhov SL, Khrisanforova OA, Legostaeva EV, Zavidnaya AG, et al. Functional coatings for implants. *Pacific Medical Journal*. 2012;1:12–9 (In Russ).]
15. Костив Р.Е., Калинин С.Г., Матвеева Н.Ю., Костив Е.П., Пузь А.В. Остеогенерирующие свойства кальций-фосфатного покрытия на сплаве титана Ti-6Al-4V in vivo. *Современные проблемы развития фундаментальных и прикладных наук. Материалы I Международной научно-практической конференции*. 2016;33–6. [Kostiv RE, Kalinichenko SG, Matveeva NYu, Kostiv EP, Puz AV. Osteogenesis properties of calcium-phosphate coating on titanium alloy Ti-6Al-4V in vivo. *Modern problems of the development of fundamental and applied sciences. Materials of the I International Scientific and Practical Conference*. 2016;33–6 (In Russ).]
16. Cheng L, Ye F, Yang R, Lu X, Shi Y, Li L, et al. Osteoinduction of hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula. *Acta Biomater*. 2010;6(4):1569–74.
17. Калинин С.Г., Матвеева Н.Ю., Костив Р.Е., Пузь А.В. Сосудистый эндотелиальный фактор роста и трансформирующий фактор роста- β 2 в костной ткани крыс при установке после перелома титановых имплантатов с биоактивными биорезорбируемыми покрытиями. *Бюл. эксп. биол. и мед*. 2016;162(11):626–31. [Kalinichenko SG, Matveeva NYu,

- Kostiv RE, Puz' AV. Role of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 2 in rat bone tissue after bone fracture and placement of titanium implants with bioactive biodegradable coatings. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017;162(5): 671–5 (In Russ).]
18. Nickel J, Mueller TD. Specification of BMP signaling. *Cells*. 2019;8(12):1579. doi: 10.3390/cells8121579
 19. Матвеева Н.Ю., Костив Р.Е., Калиниченко С.Г., Пузь А.В., Плехова Н.Г. Динамика регенерации перелома бедренной кости крыс с применением титанового имплантата с поверхностно активным покрытием. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015;10–5:849–53. [Matveeva NYu, Kostiv RE, Kalinichenko SG, Puz AV, Plechova NG. Dynamics of regeneration of a broken hipbone of rats with the use of the titanium implant with the active surface cover. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2015;10–5:849–53 (In Russ).]
 20. Kalinichenko SG, Matveeva NY, Kostiv RE, Edranov SS. The effect of calcium phosphate biodegradable coatings of titanium implants on cell differentiation and apoptosis in rat bone tissue after experimental fracture. *Biomed Mater Eng*. 2021; 32(1):53–62.
 21. Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res*. 2009;24(4):597–605.
 22. Wang X, Kua H-Y, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q, et al. p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J Cell Biol*. 2006;172(1):115–25.
 23. Komori T. Cell death in chondrocytes, osteoblasts, and osteocytes. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2045. doi: 10.3390/ijms17122045
 24. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(2):85–100.
 25. Li X, White G, Connolly C, Marsh D. Cell proliferation and apoptosis during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2002;17(5):791–9.
 26. Dumic-Cule I, Peric M, Kucko L, Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in fracture repair. *Int Orthop*. 2018;42(11):2619–26.
 27. Kalinichenko SG, Matveeva NY, Kostiv RE, Edranov SS. The topography and proliferative activity of cells immunoreactive to various growth factors in rat femoral bone tissues after experimental fracture and implantation of titanium implants with bioactive biodegradable coatings. *Biomed Mater Eng*. 2019;30(1):85–95.
 28. Economou AD, Hill CS. Temporal dynamics in the formation and interpretation of Nodal and BMP morphogen gradients. *Curr Top Dev Biol*. 2020;137:363–89.
 29. Beutel BG, Danna NR, Granato R, Bonfante EA, Marin C, Tovar N, et al. Implant design and its effects on osseointegration over time within cortical and trabecular bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016;104(6):1091–7.
 30. Aravamudhan A, Ramos DM, Nip J, Subramanian A, James R, Harmon MD, et al. Osteoinductive small molecules: growth factor alternatives for bone tissue engineering. *Cur Pharm Des*. 2013;19:3420–8.
 31. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*. 2018;59(2):99–107.
 32. Grgurevic L, Christensen GL, Schulz TJ, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in inflammation, glucose homeostasis and adipose tissue energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;27:105–8.
 33. Kowalczewski CJ, Saul JM. Biomaterials for the delivery of growth factors and other therapeutic agents in tissue engineering approaches to bone regeneration. *Front Pharmacol*. 2018;9:513. doi: 10.3389/fphar.2018.00513
 34. Hyzy SL, Olivares-Navarrete R, Ortman S, Boyan BD, Schwartz Z. Bone morphogenetic protein 2 alters osteogenesis and anti-inflammatory profiles of mesenchymal stem cells induced by microtextured titanium in vitro. *Tissue Engineering: Part A*. 2017;23(19, 20):1132–41.
 35. Костив Р.Е., Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю. Трофические факторы роста костной ткани, их морфогенетическая характеристика и клиническое значение. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2017;1:10–6. [Kostiv RE, Kalinichenko SG, Matveeva NYu. Trophic factors of bone growth, their morphogenetic characterization and clinical significance. *Pacific Medical Journal*. 2017;1:10–6 (In Russ).]
 36. Haumer A, Bourguin PE, Occhetta P, Born G, Tasso R, Martin I. Delivery of cellular factors to regulate bone healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;129:285–94.
 37. Awale G, Wong E, Rajpura K, W-H Lo K. Engineered bone tissue with naturally-derived small molecules. *Curr Pharm Des*. 2017;23(24):3585–94.
 38. Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;94:3–12.
 39. Jain A.P, Pundir S., Sharma A. Bone morphogenetic proteins: the anomalous molecules. *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(5):583–6.
 40. Han QQ, Du Y, Yang PS. The role of small molecules in bone regeneration. *Future Med Chem*. 2013;5(14):1671–84.