

Статья

Дополнительные преимущества коллагенсодержащего термочувствительного заменителя костной ткани в качестве основы при регенерации костной ткани

Charlotte Jeanneau ^{1,†}, Jean-Hugues Catherine ^{1,2,†}, Thomas Giraud ^{1,2}, Romain Lan ^{2,3} и Imad About ^{1,*}

¹ Университет Aix-Marseille, CNRS, ISM, 13009 Марсель, Франция; jean-hugues.catherine@univ-amu.fr (J.-H.C.)

² АРМ, Больница Timone, Центр одонтологии, Отделение хирургии полости рта, 13005 Марсель, Франция; romain.lan@univ-amu.fr

³ Университет Aix-Marseille, CNRS, EFS, ADES, 13385 Марсель, Франция

* Корреспонденция: imad.about@univ-amu.fr; Tel.: +33-(0)4-86-13-68-59

† Эти авторы внесли одинаковый вклад в эту работу.

Аннотация: предварительно гидратированный термочувствительный коллагенсодержащий биоматериал OsteoBiol GTO[®] (GTO), который застывает при температуре тела и восполняет недостающий объем альвеолярной кости, теперь доступен в качестве заменителя костной ткани. Целью данного исследования была оценка ангиогенного и остеогенного потенциала GTO по сравнению с материалами OsteoBiol Gen-Os[®] (Gen-Os) и Geistlich Bio-Oss[®] (Bio-Oss). Образцы материалов инкубировали в питательной среде для получения экстрактов. Измеряли концентрацию коллагена в экстрактах, которые использовали для оценки пролиферации клеток периодонтальной связки (ПС) человека (МТТ-тест), колонизации (анализ методом зарастания царапины) и высвобождения фактора роста (ИФА). Также оценивали влияние на пролиферацию (МТТ-тест) и организацию (анализ Matrigel[®]) эндотелиальных клеток. Наконец, оценивали рекрутинг эндотелиальных клеток и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (камера Бойдена), а также активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в МСК. В экстракте GTO наблюдалась более высокая концентрация коллагена, что обеспечивало статистически значимо более высокие показатели пролиферации/колонизации клеток ПСЧ. Все исследуемые материалы усиливали секрецию фактора роста VEGF/FGF-2, а также рекрутинг, пролиферацию и организацию эндотелиальных клеток, но наиболее выраженное повышение этих показателей наблюдалось для GTO. Все исследуемые материалы усиливали рекрутинг МСК и увеличивали активность ЩФ. Однако наиболее выраженное повышение этих показателей наблюдалось для коллагенсодержащих материалов GTO и Gen-Os, которые усиливали секрецию C5a и BMP-2. В целом, GTO обладает более высоким ангиогенным/остеогенным потенциалом, чем коллагенсодержащий материал Gen-Os и неорганический материал Bio-Oss. Он служит оптимальной основой для рекрутинга эндотелиальных клеток и мезенхимальных стволовых клеток, что соответствует основным требованиям к регенерации костной ткани.

Ключевые слова: термочувствительный коллагенсодержащий заменитель костной ткани; костная трансплантация; рекрутинг стволовых клеток; ангиогенный потенциал; остеогенный потенциал

1. Введение

Резорбция альвеолярной кости после удаления зубов приводит к спадению мягких тканей, что существенно усложняет установку имплантатов и ухудшает эстетические результаты. В ряде клинических исследований оценивали самостоятельное заживление и изменения в твердых тканях без заполнения постэкстракционной лунки каким-либо костнозамещающим материалом. В систематическом обзоре 20 клинических исследований была отмечена значимая резорбция альвеолярного гребня (горизонтальная — до 3,8 мм и вертикальная — до 1,24 мм) через 6 месяцев [1].

Разработаны различные стратегии профилактики резорбции, направленные на сохранение альвеолярной кости. Они известны как методы консервации альвеолярного гребня (рисунок 1). Они преимущественно основаны на заполнении постэкстракционной лунки заменителем костной ткани. Для этой цели применяют различные аллогенные, ксеногенные и синтетические заменители костной ткани, включая фосфаты кальция, биокерамику и полимеры. Однако ни один из этих материалов не обеспечивает

оптимальную консервацию постэкстракционной лунки [2-4]. Согласно недавно опубликованному систематическому обзору 88 рандомизированных клинических исследований с консервацией альвеолярного гребня в 1740 постэкстракционных лунках с использованием различных материалов, все исследуемые материалы значительно снижали выраженность горизонтальной и вертикальной атрофии по сравнению с самостоятельным заживлением [4-7].

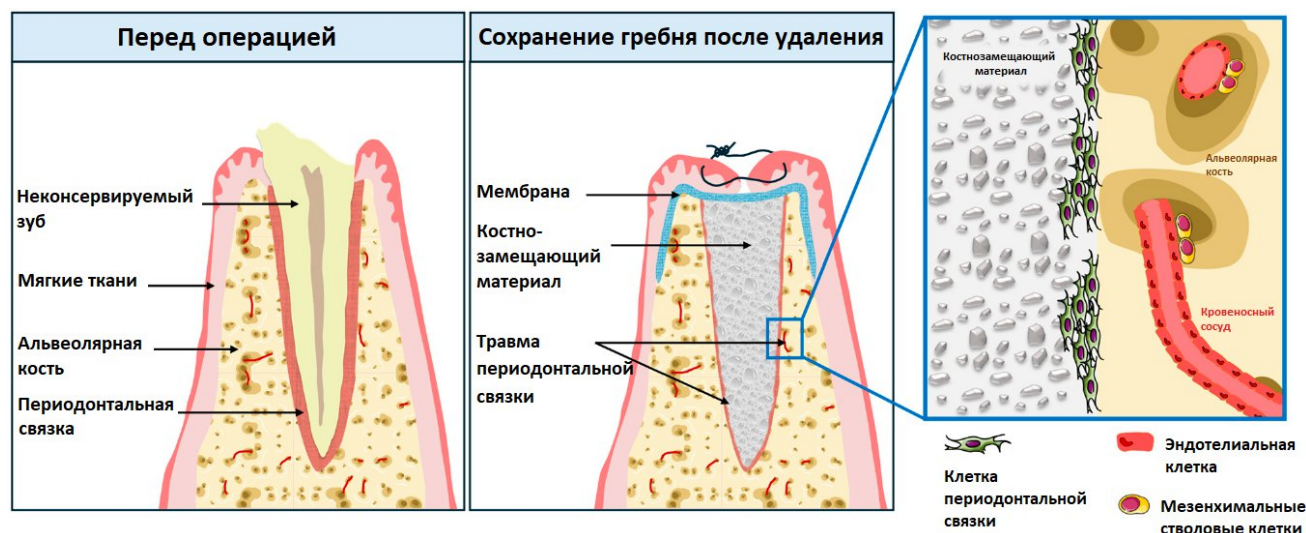


Рисунок 1. Схематическое изображение техники консервации альвеолярного гребня. Удаление зубов приводит к значительной резорбции альвеолярной кости. Техника консервации альвеолярного гребня подразумевает заполнение постэкстракционной лунки заменителем костной ткани, чтобы ограничить процесс резорбции. После применения заменитель костной ткани взаимодействует с поврежденной периодонтальной связкой, а также с эндотелиальными клетками и мезенхимальными стволовыми клетками. Взаимодействие между этими факторами играет важную роль в регенерации альвеолярной кости.

Применение коллагенизированных костнозамещающих материалов — перспективный метод снижения резорбции альвеолярной кости. В процессе заживления коллаген усиливает неоваскуляризацию, способствуя адгезии эндотелиальных клеток за счет взаимодействия сайтов связывания интегрин $\alpha 2\beta 1$ эндотелиальных клеток с RGD-последовательностями коллагена. Это обеспечивает неоваскуляризацию в заменителе костной ткани, что продемонстрировано в условиях *in vitro* [8,9], а также в гистологических исследованиях *in vivo* [10]. Гидролиз и высвобождение коллагена в процессе ремоделирования заменителя костной ткани обеспечивают хемотаксический градиент, играющий ключевую роль в рекрутинге мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека за счет их миграции (гаптотаксиса) на участок резорбции кости для формирования новой костной ткани [11]. Кроме того, негидролизированный коллаген, оставшийся после резорбции, и коллаген, образующийся при формировании костной ткани, обеспечивают участки нуклеации для минерализации новообразованной костной ткани [12]. Взаимодействие костнозамещающего материала с поврежденными клетками периодонтальной связки (ПС) человека играет важную роль в процессе регенерации альвеолярной кости. Взаимодействие коллагенсодержащих материалов с клетками ПС человека приводит к высвобождению факторов роста, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [9], которые адсорбируются на поверхности материала. При оценке активности гранул, импрегнированных фактором роста, используемых для замещения дефектов критического размера в своде черепа крыс, наблюдалось значительное усиление формирования костной ткани и повышение уровней маркеров костного ремоделирования и васкуляризации [13]. Также было установлено, что взаимодействие поврежденных клеток ПС человека с коллагенсодержащим заменителем костной ткани способствует высвобождению биологически активной молекулы компонента комплемента C5a. У этой молекулы имеются специфические рецепторы на мезенхимальных стволовых клетках костного мозга. Исследования хемотаксиса в условиях *in vitro*

свидетельствуют, что эта молекула обеспечивает хемотаксический градиент для рекрутинга мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на участок применения материала, чтобы инициировать регенерацию костной ткани. В предыдущей работе, в которой сравнивали коллагенсодержащие и неорганические заменители костной ткани в условиях *in vitro*, был отмечен более высокий ангиогенный и остеогенный потенциал коллагенсодержащих материалов по сравнению с неорганическими [14].

Большинство содержащих и не содержащих коллаген заменителей костной ткани выпускаются в виде гранул, которые могут разрушаться после их внесения в постэкстракционную лунку. Это приводит к частичному снижению регенерации альвеолярной кости, которая по определению ограничена участком применения заменителя костной ткани. Таким образом, сохранение объема/формы постэкстракционной лунки имеет решающее значение для консервации альвеолярного гребня.

Недавно на рынок был выпущен предварительно гидратированный коллагенсодержащий гетерологичный биоматериал в сочетании с термочувствительным гелем: OsteoBiol GTO® (GTO). Данный материал на 80 % состоит из ксеногенного коллагенсодержащего кортикально-губчатого костного материала в виде гранул размером 600–1000 микрон, смешанных с 20 % TSV геля. Этот гидрогель, содержащий коллаген типов I и III, а также полиненасыщенные жирные кислоты и термочувствительный синтетический сополимер, становится липким при комнатной температуре и легко адаптируется к участку нанесения. Когда вносится при температуре тела - он загустевает, что обеспечивает стабильность размеров. Это упрощает применение и сохраняет пространство для образования новой костной ткани. В то же время он ограничивает миграцию клеток десны в постэкстракционную лунку.

Насколько известно авторам, исследования применения этого материала *in vitro* или *in vivo* в контексте консервации альвеолярного гребня не проводились. Целью данного исследования была оценка ангиогенного и остеогенного потенциала GTO по сравнению с другим ксеногенным коллагенсодержащим материалом (OsteoBiol® Gen-Os®, Gen-Os) и неорганическим заменителем костной ткани (Geistlich Bio-Oss®, Bio-Oss). Некоторые свойства этих материалов представлены на рисунке 2.



Рисунок 2. Используемые заменители костной ткани. Масштаб: 1 мм.

В данном исследовании применяли модель *in vitro*, имитирующую консервацию альвеолярного гребня после удаления зубов в клинических условиях, с использованием поврежденных клеток периодонтальной связки человека (рисунок 1). Эту модель использовали для оценки влияния

коллагенсодержащего термочувствительного заменителя костной ткани на пролиферацию/колонизацию клеток ПС человека, а также его ангиогенного/остеогенного потенциала.

2. **Материалы и методы**

2.1. *Реактивы*

Все питательные среды для культивирования клеток и реактивы были приобретены в компании Dominique Dutscher (Брюмат, Франция). Костнозамещающие материалы GTO[®] (GTO) и Gen-Os[®] (Gen-Os) из линейки OsteoBioI[®] были приобретены в компании Tecnos[®] Dental s.r.l. (Турин, Италия), а материал Geistlich Bio-Oss[®] (Bio-Oss) — в компании Geistlich Pharma (Вольхузен, Швейцария).

2.2. *Культура клеток*

Клетки периодонтальной связки человека получали из неповрежденных третьих моляров, недавно удаленных из ортодонтических соображений, в соответствии с законодательством Франции и соглашением этического комитета Университета Экс-Марсель (№: 2022-05-12-003). После удаления зубы промывали, а периодонтальную связку механически удаляли путем соскабливания со средней трети поверхности корня зуба с помощью стерильной кюретки. Ткани удаленной периодонтальной связки измельчали и культивировали полученные эксплантаты в чашках Петри диаметром 100 мм. Конфлюэнтные культуры собирали путем трипсинизации и пересевали. Клетки культивировали в минимальной питательной среде (MEM) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, глутамина в концентрации 2 ммоль/л, пенициллина в концентрации 100 МЕ/мл, 100 мкмоль стрептомицина и амфотерицина В в концентрации 0,25 мкг/мл при 37 °С в атмосфере, содержащей 95 % воздуха и 5 % CO₂.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга человека и эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) были приобретены в компании PromoCell (Гейдельберг, Германия); их культивировали в оптимизированной среде PromoCell соответственно. Питательные среды для МСК 2 (MGM-2) и эндотелиальных клеток 2 (EGM-2) хранили при 37 °С в атмосфере, содержащей 95 % воздуха и 5 % CO₂.

2.3. *Экстракты заменителя костной ткани*

Для получения экстрактов заменителей костной ткани каждый материал инкубировали отдельно в каждой из трех питательных сред без сыворотки. В зависимости от типа эксперимента экстракты готовили с использованием: MEM для культуры клеток ПС; MGM-2 для культуры мезенхимальных стволовых клеток или EGM-2 для культуры эндотелиальных клеток при концентрации 20 мг/мл (37 °С, 24 часа). Образцы центрифугировали и собирали надосадочную жидкость. Надосадочную жидкость, содержащую экстракты исследуемых материалов, использовали для следующих протоколов экспериментов, как показано на рисунке 3.

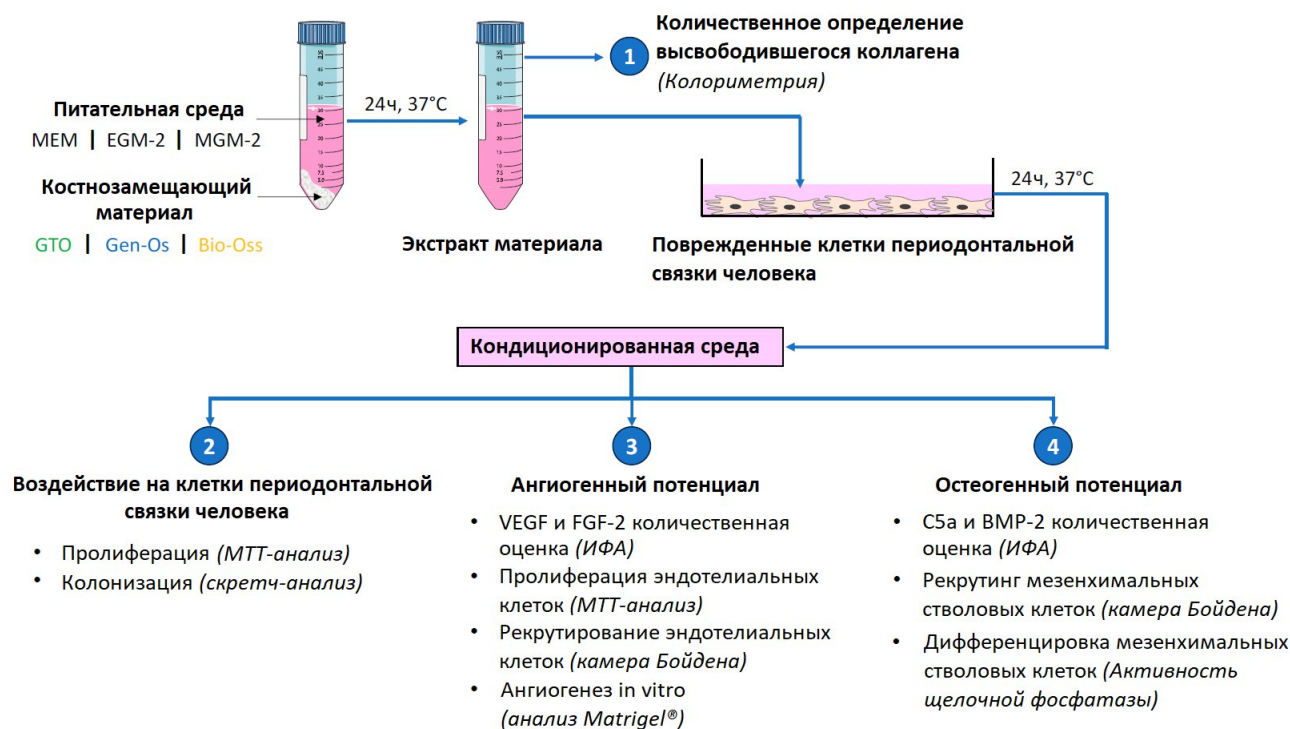


Рисунок 3. Схема проведения эксперимента. Экстракты исследуемых материалов получали путем инкубации заменителей костной ткани в соответствующих питательных средах (24 часа, 37 °C, 5 % CO₂). Концентрацию коллагена в экстрактах измеряли путем количественного определения гидроксипролина с помощью колориметрического метода. Физически поврежденные клетки ПС инкубировали с полученными экстрактами в течение 24 часов. Надосадочную жидкость из культур поврежденных клеток ПС (кондиционированная среда) наносили на интактные клетки ПС для оценки их пролиферации с помощью МТТ-теста. Колонизацию клеток ПС на поврежденном участке оценивали методом зарастания царапины. Секрецию VEGF и FGF-2 в кондиционированной среде количественно оценивали с помощью ИФА. Кондиционированные среды наносили на эндотелиальные клетки (HUVEC) для оценки их пролиферации с помощью МТТ-теста, ангиогенного потенциала с помощью анализа Matrigel® и рекрутинга с помощью камеры Бойдена. Секрецию C5a и BMP-2 в кондиционированной среде количественно оценивали с помощью ИФА. Кондиционированные среды наносили на культуры МСК для количественной оценки их миграции с помощью камеры Бойдена, а также для оценки их остеогенного потенциала с помощью анализа щелочной фосфатазы.

2.4. Измерение концентрации коллагена в экстрактах исследуемых материалов

Концентрацию коллагена количественно оценивали в экстрактах, полученных в питательной среде MEM, используя коммерчески доступный набор для определения гидроксипролина с помощью колориметрического метода (анализ общего содержания коллагена QuickZyme, QuickZyme Biosciences B.V., Лейден, Нидерланды), путем измерения оптической плотности при длине волны 570 нм с использованием спектрофотометра (Σ960, MeterTech, Тайбэй, Тайвань).

2.5. Приготовление кондиционированных сред

Субконфлюэнтные культуры клеток ПС в 6-луночных планшетах промывали, наносили повреждения с помощью стерильного скальпеля (5 горизонтальных и 5 вертикальных линий) и инкубировали с 2 мл экстракта материала (20 мг/мл) или в бессывороточной контрольной среде. Через 24 часа собирали надосадочную жидкость, которую использовали в качестве кондиционированной среды для следующих экспериментов. В зависимости от эксперимента кондиционированную среду готовили с использованием MEM, MGM-2 или EGM-2.

2.6. Проллиферация клеток

HUVEC или клетки ПС культивировали при низкой плотности (1000 клеток/см²) в 96-луночных

планшетах. Питательные среды заменяли кондиционированными средами. Через 3, 6 и 9 дней удаляли надосадочную жидкость и выполняли МТТ-тест. Среда удаляла и немедленно заменяла 0,5 % 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом в концентрации 1 мл/лунка. После инкубации в течение 2 часов при 37 °С удаляли надосадочную жидкость и растворяли кристаллы формазана в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 100 мкл/лунка. Кондиционированные среды без экстрактов материалов использовали в качестве контроля. Оптическую плотность в каждом 6-луночном планшете измеряли с помощью автоматического спектрофотометра для микропланшетов (Σ960) при длине волны 550 нм. Результаты выражали в процентах от контроля (кондиционированная среда MEM для клеток ПС и кондиционированная среда EGM-2 для эндотелиальных клеток).

2.7. Анализ методом зарастания царапины

Влияние исследуемых материалов на колонизацию клеток ПС оценивали методом зарастания царапины. Конфлюэнтные клетки ПС (30 000 клеток/см²), выращенные в 6-луночных планшетах, повреждали наконечником пипетки и инкубировали с кондиционированной средой. Кондиционированные среды MEM без экстрактов использовали в качестве контроля. После инкубации в течение 12 часов ядра клеток окрашивали DAPI в концентрации 1 мг/мл (20 минут) и подсчитывали клетки, мигрирующие на участок повреждения, в пяти случайных полях под флуоресцентным микроскопом Carl Zeiss Axiovert200 (Carl Zeiss S.A.S., Марли-ле-Руа, Франция). Результаты выражены в процентах от контроля (кондиционированная среда MEM).

2.8. Количественное определение остеогенного/ангиогенного фактора роста и белка компонента C5a

Секрецию VEGF, фактора роста фибробластов 2 (FGF-2), костного морфогенетического белка 2 (BMP-2) и C5a в кондиционированных средах количественно оценивали с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов DuoSET (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США) в соответствии с инструкциями производителя.

2.9. Рекрутинг клеток

Анализ миграции клеток выполняли в 12-луночных планшетах (нижний отсек камеры Бойдена) со вставкой диаметром 8 мм (верхний отсек камеры Бойдена). Конфлюэнтные клетки ПС культивировали в нижнем отсеке. После промывания MEM клетки повреждали и инкубировали либо в MEM (контроль), либо с экстрактом материала (1 мл). В верхнем отсеке культивировали HUVEC или MCK в 100 мкл среды MEM (104 клеток/лунка). Через 24 часа мигрирующие клетки на нижней стороне мембраны фиксировали (15 минут, холодный 70 % этанол) и окрашивали (20 минут, DAPI). Мигрирующие клетки на нижней стороне мембраны подсчитывали в пяти случайных полях под флуоресцентным микроскопом. Результаты выражены в процентах от контроля (клетки, мигрирующие в ответ на повреждение клеток ПС при инкубации в бессывороточной среде MEM).

2.10. Неоангиогенез

Для оценки ангиогенной способности HUVEC (4×10^5 клеток/лунка) высевали на внеклеточный матрикс Matrigel® и культивировали в кондиционированной среде. Организацию эндотелиальных клеток оценивали с помощью фазово-контрастного микроскопа (Carl Zeiss AxioERT200) после культивирования в течение 24 часов. Ангиогенную способность количественно оценивали путем подсчета закрытых структур. Результаты выражены в процентах от контроля (кондиционированная среда EGM-2).

2.11. Активность ЩФ в мезенхимальных стволовых клетках

Остеогенную дифференцировку MCK оценивали путем количественной оценки активности щелочной фосфатазы (ЩФ) с использованием колориметрического набора ALP (Abscam, Кембридж, Великобритания). MCK (10^5 клеток) инкубировали в 6-луночных планшетах в кондиционированной среде в течение 7 дней. После достижения конфлюэнтности и диссоциации с использованием трипсина подсчитывали количество клеток. После промывания клетки собирали с помощью буфера для лизиса клеток с концентрацией 50 мкл/ 10^5 и трехкратной обработки в ультразвуковой ванне по 10 секунд. Образцы центрифугировали при 4 °С в течение 15 минут для удаления любого нерастворимого материала; надосадочную жидкость

собирали и хранили на льду. Образцы помещали в 96-луночный планшет и измеряли активность ЩФ в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм с помощью автоматического спектрофотометра для микропланшетов (Σ960). Результаты выражены в процентах от контроля (кондиционированная среда MGM-2).

2.12. Статистический анализ

Все эксперименты выполняли как минимум в трех повторностях в трех разных популяциях клеток. Статистическую значимость ($p < 0,05$) определяли с помощью критерия Стьюдента. При этом сравнивали наборы данных для каждого материала и соответствующих контрольных образцов.

3. Результаты

3.1. В экстрактах коллагенсодержащих материалов наблюдается высвобождение коллагена

Коллаген был обнаружен в экстрактах коллагенсодержащих материалов, но не в экстракте неорганического материала Bio-Oss. Концентрация коллагена в экстракте GTO была в четыре раза выше, чем в экстракте Gen-Os (рисунок 4).

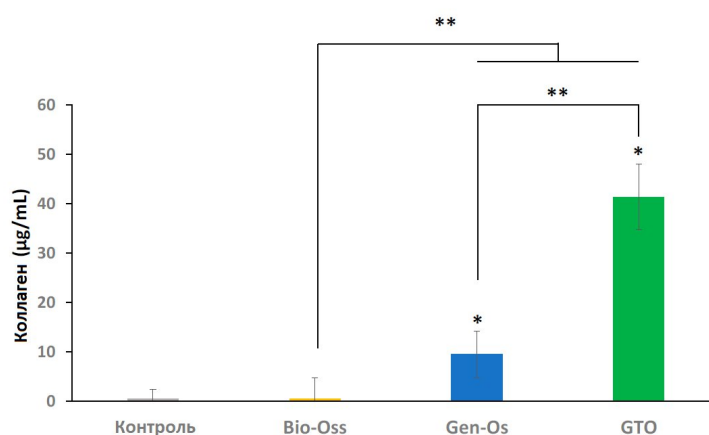


Рисунок 4. Измерение концентрации коллагена в экстрактах. Значимое высвобождение коллагена наблюдалось в экстрактах коллагенсодержащих материалов Gen-Os и GTO. Концентрация коллагена в экстракте GTO была в четыре раза выше, чем в экстракте Gen-Os. Коллаген не был обнаружен в экстракте неорганического материала, что было ожидаемо.

* Статистически значимые различия с контролем (MEM).

** Статистически значимые различия между двумя материалами ($p < 0,05$).

3.2. Влияние исследуемых материалов на клетки периодонтальной связки человека

3.2.1. Заменители костной ткани усиливали пролиферацию клеток ПС человека

Пролиферация клеток ПС статистически значимо увеличилась при применении трех заменителей костной ткани через 3, 6 и 9 дней по сравнению с контролем. Пролиферация клеток через 6 и 9 дней при применении Gen-Os и GTO была статистически значимо более выраженной, чем при применении Bio-Oss (рисунок 5A).

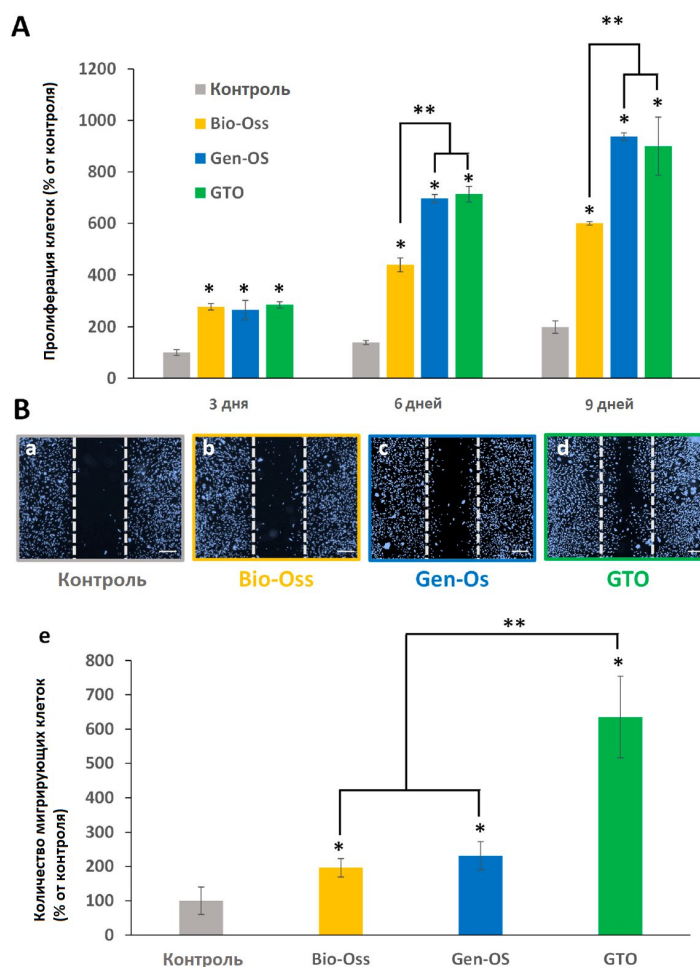


Рисунок 5. (A) Влияние исследуемых материалов на пролиферацию клеток ПС человека. Все исследуемые материалы статистически значимо увеличивали пролиферацию клеток через 3, 6 и 9 дней по сравнению с контролем (кондиционированная среда MEM). Однако начиная с 6-го дня увеличение данного показателя в группах Gen-Os и GTO было статистически значимо более выраженным, чем в группе Bio-Oss. (B) Анализ методом зарастания царапины для клеток ПС человека, культивируемых в течение 24 часов с кондиционированной средой. (a–d) Репрезентативные снимки, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа: (a) контроль, (b) Bio-Oss, (c) Gen-Os и (d) GTO. Двумя вертикальными пунктирными линиями обозначена исходная бесклеточная зона на участке повреждения; подсчитывали количество клеток, мигрирующих для колонизации этого участка. Масштаб: 500 мкм. (e) Количество клеток, мигрирующих на участок повреждения, статистически значимо увеличивалось при применении всех исследуемых материалов, но в большей степени при применении GTO. Результаты выражены в процентах от контроля (кондиционированная среда MEM).

* Статистически значимые различия с контролем.

** Статистически значимые различия между двумя материалами ($p < 0,05$).

3.2.2. Заменители костной ткани усиливали колонизацию клеток ПС человека

При анализе методом зарастания царапины все исследуемые материалы статистически значимо увеличивали колонизацию клеток ПС на участке повреждения (бесклеточная зона) по сравнению с контролем (кондиционированная среда MEM). Однако это увеличение было статистически значимо более выраженным при применении GTO по сравнению с Bio-Oss или Gen-Os (рисунок 5B).

3.3. Ангиогенный потенциал

3.3.1. Заменители костной ткани увеличивали секрецию ангиогенных факторов роста клетками ПС человека

Хотя секреция VEGF и FGF-2 увеличивалась при применении всех исследуемых материалов, увеличение данного показателя для коллагенсодержащих материалов было более выраженным, чем для

Bio-Oss. Наибольшее увеличение наблюдалось при применении GTO (рисунок 6).

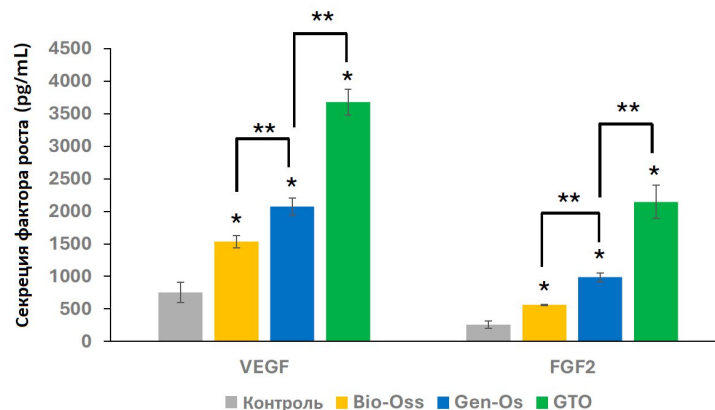


Рисунок 6. Секреция ангиогенного фактора роста клетками ПС человека. Согласно результатам ИФА, все исследуемые материалы статистически значимо увеличивали секрецию VEGF и FGF-2 по сравнению с контролем (кондиционированная среда MEM), но наиболее выраженное увеличение наблюдалось при применении GTO. Результаты выражены в пг/мл.

* Статистически значимые различия с контролем.

** Статистически значимые различия между двумя материалами ($p < 0,05$).

3.3.2. Заменители костной ткани усиливали пролиферацию эндотелиальных клеток

Статистически значимое усиление пролиферации HUVEC наблюдалось для всех исследуемых материалов. Пролиферация при применении Gen-Os и GTO была статистически значимо более выраженной, чем при применении Bio-Oss, начиная с 6-го дня. На 9-й день увеличение данного показателя при применении GTO было более выраженным, чем при применении Gen-Os (рисунок 7A).

3.3.3. Коллагенсодержащие материалы усиливали рекрутинг эндотелиальных клеток

Наблюдалось статистически значимое увеличение рекрутинга HUVEC при применении коллагенсодержащих материалов Gen-Os и GTO по сравнению с контролем (кондиционированная среда MEM) или Bio-Oss. Увеличение данного показателя при применении GTO было в четыре раза выше, чем при применении Gen-Os (рисунок 7B).

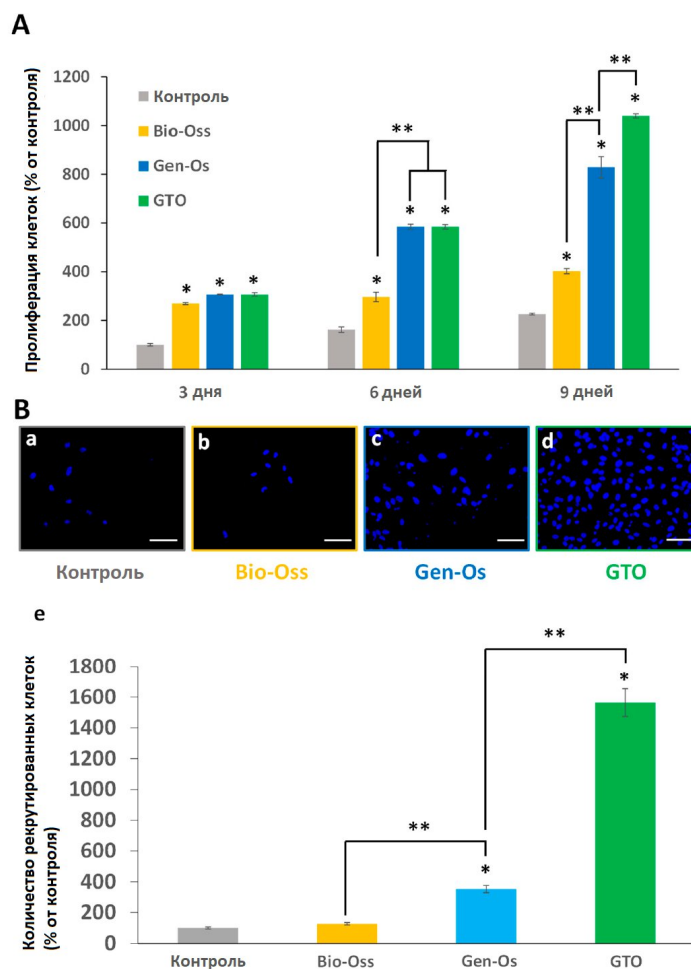


Рисунок 7. (А) Влияние исследуемых материалов на пролиферацию HUVEC. Все исследуемые материалы статистически значимо усиливали пролиферацию клеток по сравнению с контролем (кондиционированная среда EGM-2). Однако на 6-й и 9-й дни увеличение данного показателя было статистически значимо более выраженным для Gen-Os и GTO по сравнению с Bio-Oss. **(В)** Влияние исследуемых материалов на миграцию HUVEC в камере Бойдена. **(a-d)** Репрезентативные снимки, используемые для подсчета мигрирующих клеток.

(a) Контроль, **(b)** Bio-Oss, **(c)** Gen-Os и **(d)** GTO (масштаб: 50 мкм). **(e)** Согласно результатам анализа данных, только Gen-Os и GTO статистически значимо усиливали рекрутинг HUVEC по сравнению с контролем или неорганическим материалом Bio-Oss. Увеличение данного показателя было в четыре раза выше при применении GTO, чем при применении Gen-Os. Результаты выражены в процентах от контроля (кондиционированная среда EGM-2).

* Статистически значимые различия с контролем.

** Статистически значимые различия между двумя материалами ($p < 0,05$).

3.3.4. Заменители костной ткани усиливали образование трубкоподобных структур

После культивирования эндотелиальных клеток на Matrigel® (Corning, Нью-Йорк, США) в течение 24 часов наблюдалось образование капилляроподобных закрытых структур, состоящих из хорошо организованных эндотелиальных клеток, при применении всех исследуемых материалов, а также при применении контроля (кондиционированная среда EGM-2). Среди трех исследуемых материалов коллагенсодержащие заменители костной ткани оказывали более выраженное действие, а GTO индуцировал образование наибольшего количества трубкоподобных структур (рисунок 8).

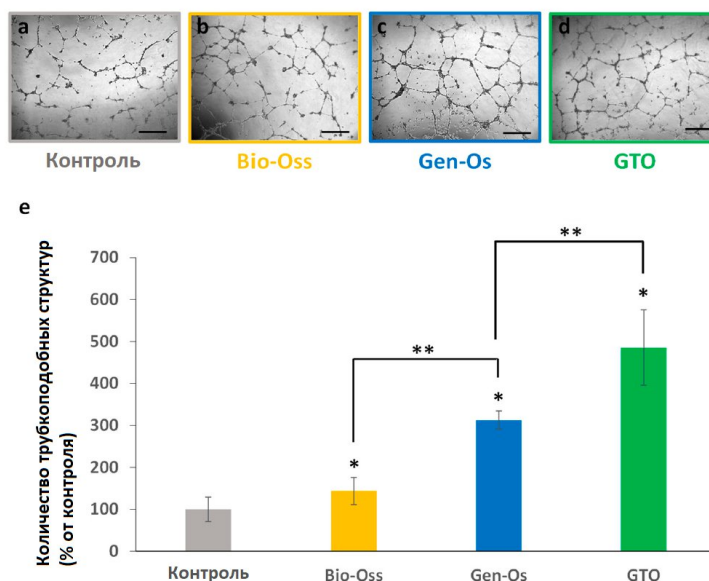


Рисунок 8. Влияние заменителей костной ткани на неоангиогенез *in vitro*. При инкубации HUVEC с кондиционированной средой они организовывались в закрытые структуры и образовывали капиллярподобную сеть. (a–d) Репрезентативные снимки, полученные с помощью оптического микроскопа: (a) Контроль (кондиционированная среда EGM-2), (b) Bio-Oss, (c) Gen-Os и (d) GTO (масштаб: 50 мкм). (e) Количество закрытых трубкоподобных структур статистически значимо увеличивалось при применении всех исследуемых материалов, но при применении GTO увеличение данного показателя было более выраженным. Результаты выражены в процентах от контроля (кондиционированная среда EGM-2).

* Статистически значимые различия с контролем.

** Статистически значимые различия между двумя материалами ($p < 0,05$).

3.4. Остеогенный потенциал

3.4.1. Коллагенсодержащие материалы усиливали секрецию C5a и BMP-2 клетками ПС человека

Gen-Os и GTO статистически значимо увеличивали секрецию C5a и BMP-2 по сравнению с контролем (кондиционированная среда MEM) и Bio-Oss. Увеличение данного показателя при применении GTO было статистически значимо более выраженным, чем при применении Gen-Os (рисунок 9).

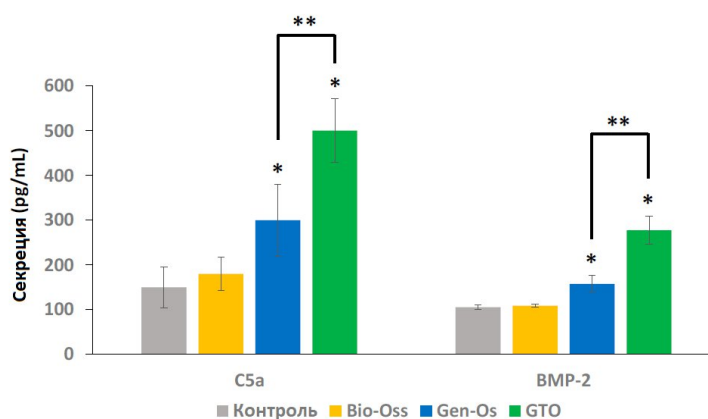


Рисунок 9. Секреция компонента комплемента C5a и фактора роста BMP-2 клетками ПС человека Согласно результатам ИФА, Gen-Os и GTO статистически значимо увеличивали секрецию C5a и BMP-2 по сравнению с контролем (кондиционированная среда MEM) и Bio-Oss. Увеличение данного показателя было статистически значимо более выраженным при применении GTO. Результаты выражены в пг/мл.

* Статистически значимые различия с контролем.

** Статистически значимые различия между двумя материалами ($p < 0,05$).

3.4.2. Заменители костной ткани усиливали рекрутинг мезенхимальных стволовых клеток

Когда клетки ПС человека, культивируемые в нижнем отсеке камеры Бойдена, инкубировали с экстрактами исследуемых материалов, значительное количество МСК мигрировало в нижний отсек при применении всех исследуемых материалов. Увеличение данного показателя при применении коллагенсодержащих материалов Gen-Os и GTO было статистически значимо более выраженным, чем при применении Bio-Oss (рисунок 10А).

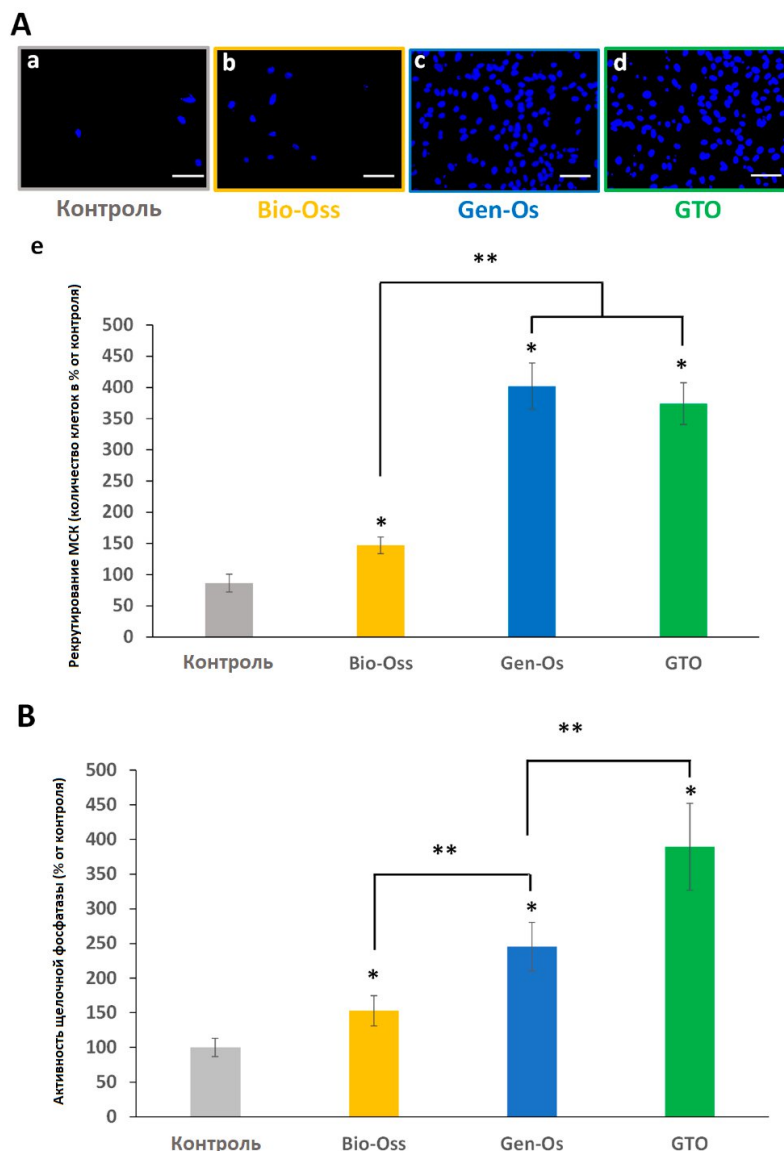


Рисунок 10. (А) Влияние исследуемых материалов на миграцию МСК в камере Бойдена. (a–d) Репрезентативные снимки, используемые для подсчета мигрирующих клеток. (a) Контроль (кондиционированная среда MEM), (b) Bio-Oss, (c) Gen-Os и (d) GTO (масштаб: 50 мкм). (e) Согласно полученным данным, все исследуемые материалы статистически значимо усиливали миграцию МСК по сравнению с контролем. Однако количество мигрирующих клеток было статистически значимо выше при применении коллагенсодержащих материалов Gen-Os и GTO по сравнению с неорганическим материалом Bio-Oss. Результаты выражены в процентах от контроля. (В) Измерение активности щелочной фосфатазы. Инкубация МСК в течение 7 дней с кондиционированной средой для всех исследуемых материалов статистически значимо увеличивала активность щелочной фосфатазы по сравнению с контролем (кондиционированная среда MGM-2). Увеличение данного показателя было статистически значимо более выраженным для Gen-Os и GTO по сравнению с Bio-Oss. Увеличение активности щелочной фосфатазы при применении GTO было статистически значимо более выраженным, чем при применении Gen-Os. Результаты выражены в процентах от контроля.

* Статистически значимые различия с контролем.

** Статистически значимые различия между двумя материалами ($p < 0,05$).

3.4.3. Заменители костной ткани увеличивали активность щелочной фосфатазы в мезенхимальных стволовых клетках

Все исследуемые материалы статистически значимо увеличивали активность ЩФ в МСК по сравнению с контролем (кондиционированная среда MGM-2). Статистически значимое увеличение наблюдалось при инкубации МСК с коллагенсодержащими материалами GTO и Gen-Os по сравнению с неорганическим материалом Bio-Oss. Увеличение данного показателя при применении GTO было статистически значимо более выраженным, чем при применении Gen-Os (рисунок 10B).

4. Обсуждение

Согласно результатам данного исследования, предварительно гидратированный термочувствительный коллагенсодержащий заменитель костной ткани GTO обладает значительным ангиогенным и остеогенным потенциалом и может использоваться в качестве основы для рекрутинга как эндотелиальных клеток, так и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при регенерации костной ткани.

Взаимодействие термочувствительного заменителя костной ткани с поврежденными клетками периодонтальной связки человека статистически значимо усиливает секрецию факторов роста VEGF, FGF-2 и BMP-2, а также биологически активной молекулы компонента комплемента C5a. Данный показатель был статистически значимо выше, чем для неорганического заменителя костной ткани Bio-Oss, а также выше, чем для другого коллагенсодержащего заменителя костной ткани (Gen-Os).

Секреция этих молекул при взаимодействии заменителей костной ткани с клетками-мишенями периодонтальной связки — известное явление [9,14]. Установлено, что поврежденные фибробласты и клетки периодонтальной связки человека секретируют ангиогенные факторы VEGF и FGF-2, которые усиливают пролиферацию эндотелиальных клеток, адгезию на коллагеновых волокнах и образование трубкоподобной сети *in vitro* [9,15]. Механизм, посредством которого VEGF индуцирует адгезию эндотелиальных клеток к коллагену, исследовали в условиях *in vitro*. Было установлено, что VEGF индуцирует экспрессию белков на поверхности эндотелиальных клеток для двух рецепторов коллагена, интегринов $\alpha1\beta1$ и $\alpha2\beta1$, путем индукции мРНК, кодирующих субъединицы $\alpha1$ и $\alpha2$. Комбинация блокирующих антител к субъединицам $\alpha1$ и $\alpha2$ обеспечивала выраженное ингибирование индуцированного VEGF ангиогенеза в условиях *in vitro*. Это было подтверждено в условиях *in vivo* после подкожного введения Matrigel® и клеток, трансфицированных VEGF, у бестимусных мышей [8,16]. Это позволяет расширить представления о роли коллагена в заменителе костной ткани, а также об индукции секреции VEGF при взаимодействии материала с поврежденной пародонтальной связкой. Усиление экспрессии рецепторов коллагена на эндотелиальных клетках усиливает их адгезию на коллагеновых волокнах и неоангиогенез.

Кроме того, известно, что BMP-2 играет важную роль в качестве фактора роста при формировании костной ткани [17], а его экспрессия важна для заживления переломов костей [18] и формирования паттернов во время эмбрионального развития [19]. Установлено, что BMP-2 индуцирует дифференцировку остеобластов *in vitro* [20] и способствует регенерации костной ткани в дефектах критического размера в своде черепа крыс *in vivo* [21]. Это объясняет, почему данный материал был одобрен FDA для регенерации костной ткани и выпущен на рынок (Medtronic®, Миннеаполис, Миннесота, США) в качестве заменителя костной ткани (Infuse®), состоящего из рекомбинантного человеческого костного морфогенетического белка 2 и абсорбируемой матрицы из коллагеновой губки. Известны случаи его применения при артродезе позвонков, свежих переломах большеберцовой кости и костной трансплантации в челюстно-лицевой области [22].

Установлено, что комбинированная секреция BMP-2 и VEGF оказывает синергетический эффект при регенерации костной ткани. При трансдукции миогенных стволовых клеток мышей для экспрессии BMP-2 применение sFIT1 в качестве специфического антагониста VEGF значительно ингибировало образование костной ткани, индуцированное BMP-2. Напротив, применение экзогенного VEGF усиливало образование костной ткани, индуцированное BMP-2, и регенерацию костной ткани за счет улучшения ангиогенеза. Это

было продемонстрировано при формировании эктопической кости у мышей и заживлении дефектов критического размера в черепе, согласно результатам рентгенографии и окрашивания по фон Косса на гистологических срезах [23]. Усиление образования костной ткани, по-видимому, связано с усилением рекрутинга стволовых клеток костного мозга и эндотелиальных клеток. Данное усиление рекрутинга обусловлено секрецией биологически активного компонента комплемента C5a при взаимодействии коллагенсодержащего материала с клетками периодонтальной связки, как было продемонстрировано ранее для материала Gen-Os. Установлено, что после секреции C5a связывается со специфическим рецептором (C5aR) на мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и фосфорилирует его, что приводит к пролиферации и рекрутингу этих клеток [14]. Экспрессия C5aR при переломах также задействована в процессах дифференцировки остеобластов и регенерации костной ткани у крыс [24]. Уровень C5a при применении термочувствительного заменителя костной ткани в данном исследовании, был выше, чем для неорганического материала Bio-Oss, и даже выше, чем для коллагенсодержащего материала Gen-Os. Это свидетельствует о более высоком остеогенном потенциале термочувствительного материала GTO.

Примечательно, что GTO усиливал рекрутинг как мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, так и эндотелиальных клеток. Это подчеркивает, что данный термочувствительный материал служит оптимальной основой как для эндотелиальных клеток, так и для мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, которые необходимы для регенерации костной ткани. Согласно результатам предыдущего исследования, мезенхимальные стволовые клетки высвобождают VEGF и FGF-2, которые адсорбируются на гранулах коллагенсодержащего материала Gen-Os. Гранулы с адсорбированными факторами роста усиливали остеогенный потенциал за счет повышения уровней таких остеогенных маркеров, как фактор транскрипции 2, связанный с карликовостью (RUNX2), остеоопонтин, остеоонектин, остеокальцин и коллаген типа I, по сравнению с гранулами из нативной кости. В гранулах с адсорбированными факторами роста также наблюдалось выраженное увеличение экспрессии маркеров эндотелиальных клеток (CD31, фактора фон Виллебранда и VEGF). При применении этих гранул с адсорбированными факторами роста для замещения дефектов в своде черепа крыс они усиливали ангиогенез и образование новой костной ткани [13].

Примечательно, что уровень секреции факторов роста для GTO при его взаимодействии с клетками периодонтальной связки человека был выше, чем для Gen-Os, хотя гранулы обоих материалов содержат коллаген. Аналогичным образом, пролиферация эндотелиальных клеток и ангиогенный потенциал были выше при применении GTO. Кроме того, рекрутинг эндотелиальных клеток и мезенхимальных стволовых клеток был статистически значимо более выраженным при применении GTO. Это неожиданный результат, и возникает вопрос, чем обусловлено это различие. GTO на 80 % состоит из коллагенсодержащего кортикально-губчатого костного материала в виде гранул размером 600–1000 мкм, тщательно смешанных с 20 % гелем TSV, содержащим коллаген типов I и III. Gen-Os состоит из коллагенсодержащего кортикально-губчатого костного материала в виде гранул размером 250–1000 мкм. Хотя производитель не предоставляет сведения о концентрации коллагена в гидрогеле, авторы задались вопросом, может ли этот показатель объяснять результаты, наблюдаемые в данном исследовании. Поэтому авторы выполнили оценку наличия гидроксипролина, который можно использовать в качестве прямого показателя общего содержания коллагена. Эта аминокислота содержится в тройной спирали коллагена и повышает ее стабильность. В надосадочной жидкости неорганического материала Bio-Oss коллаген обнаружен не был. При этом в надосадочной жидкости материала Gen-Os наблюдалась высокая концентрация коллагена, а его секреция при применении GTO была в четыре раза выше, чем при применении Gen-Os.

Это важный результат, позволяющий интерпретировать полученные данные и, в частности, объяснить различие между коллагенсодержащими материалами Gen-Os и GTO. Гранулы обоих материалов содержат нативный коллаген, однако GTO содержит дополнительное количество легко доступного коллагена в составе гидрогеля. В надосадочной жидкости GTO наблюдалась значимая концентрация коллагена (40 мкг/мл) через 24 часа. Установлено, что этот коллаген играет важную роль в обеспечении адгезии

эндотелиальных клеток и неоангиогенеза, а также в рекрутинге мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

Согласно ряду исследований, коллагеновые волокна обеспечивают участки адгезии для интегринов эндотелиальных клеток, что способствует адгезии эндотелиальных клеток к коллагеновым волокнам и последующей неоваскуляризации [8,16]. Кроме того, гидролиз коллагена в процессе резорбции обеспечивает хемотаксический градиент для мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, которые мигрируют на участок применения заменителя костной ткани посредством гаптотаксиса, где они дифференцируются в остеобласты для синтеза новой костной ткани.

В процессе ремоделирования костной ткани у большинства рекрутированных остеобластов, расположенных в непосредственной близости от остеокластов, присутствует эндоцитарный рецептор коллагена uPARAP/Endo180, который участвует в интернализации коллагена и миграции различных типов клеток. Установлено, что инактивация этого рецептора ингибирует образование костной ткани, что приводит к деформациям скелета. Применение антител к этому рецептору *in vitro* приводило к ингибированию интернализации коллагена в остеобластах и снижению их миграции в поверхностно-связанный коллаген согласно анализу трансмембранной миграции [11]. Миграция клеток, вызванная изменениями во внеклеточном матриксе (ВКМ), также наблюдалась в других тканях [9,25]. Этот процесс известен как гаптотаксис. В данном случае сигнал связан с ВКМ, в отличие от хемотаксиса, когда сигнал связан с растворимым фактором [26,27]. Установлено, что нерастворимый коллаген индуцирует гаптотаксис МСК у человека и кроликов [11,26].

В настоящем исследовании использовали одну концентрацию материалов в течение единственного периода времени. Это может привести к недооценке количества факторов, которые могут высвобождаться в более поздние периоды времени. Кроме того, в настоящем исследовании использовали только экстракты. Дальнейшие исследования прямого взаимодействия рассматриваемых материалов с клетками позволят получить более полное представление об их эффективности при регенерации костной ткани.

Исследования термочувствительного материала GTO немногочисленны. В единственном исследовании по оценке влияния GTO *in vitro* использовали отсортированные по STRO-1 мезенхимальные стволовые клетки пульпы зубов человека (hDPSC). Целью исследования была оценка биосовместимости GTO по сравнению с двумя другими ксеногенными заменителями костной ткани (Gen-Os и OsteoBioI[®] Apatos[®]) путем оценки влияния исследуемых материалов на морфологию, адгезию и пролиферацию hDPSC. Была подтверждена биосовместимость трех исследуемых биоматериалов. Примечательно, что при инкубации hDPSC с коллагенсодержащими материалами GTO и Gen-Os наблюдались индукция внутриклеточного остеопонтина и увеличение активности щелочной фосфатазы. Это позволяет предположить, что данные материалы повышают остеогенный потенциал этих клеток [28].

В единственном клиническом исследовании GTO оценивали его эффективность при трансcrestальном синус-лифтинге с использованием различных гетерологичных заменителей костной ткани. Было выполнено 75 процедур синус-лифтинга с установкой 89 имплантатов у 66 пациентов. Клиническую и рентгенологическую оценку проводили в течение периода последующего наблюдения продолжительностью 93 ± 55 месяцев. Случаи неприживания имплантата в течение периода последующего наблюдения выявлены не были [29].

5. Выводы

В совокупности эти данные свидетельствуют, что термочувствительный коллагенсодержащий заменитель костной ткани обладает более высоким ангиогенным и остеогенным потенциалом, чем неорганический заменитель костной ткани и коллагенсодержащий материал Gen-Os.

Исследования применения GTO для консервации альвеолярного гребня не проводились. Однако настоящее исследование свидетельствует о возможности его применения в качестве основы для костной трансплантации в хирургической стоматологии, в частности, для консервации альвеолярного гребня. Термочувствительный материал GTO соответствует критериям применения для консервации альвеолярного гребня, поскольку он загустевает при температуре тела, сохраняя объем, необходимый для

образования новой костной ткани. Кроме того, он обеспечивает оптимальную основу для рекрутинга эндотелиальных и стволовых клеток, необходимых для образования новой костной ткани. В целом, эта работа подчеркивает дополнительные преимущества коллагенсодержащего термочувствительного заменителя костной ткани в качестве основы при регенерации костной ткани.

Вклад авторов: Концепция, I.A., C.J., J.-H.C. и R.L.; методология, I.A., C.J., J.-H.C. и T.G.; проверка, I.A., C.J., T.G. и J.-H.C.; курирование данных, C.J. и J.-H.C.; черновик, I.A., C.J., T.G., R.L. и J.-H.C.; редактирование, I.A., C.J., T.G., R.L. и J.-H.C.; контроль, C.J. и I.A.; организация финансирования, I.A.; управление проектом, I.A. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Это исследование финансировалось за счет институциональных грантов Университета Экс-Марсель (Aix-Marseille University) и Национального центра научных исследований (Centre National de la Recherche Scientifique).

Заявление Институционального наблюдательного совета: Не применимо.

Заявление об информированном согласии: Не применимо.

Заявление о доступности данных: данные содержатся в статье.

Благодарности: биоматериалы OsteoBio[®] GTO[®] и OsteoBio[®] Gen-Os[®] были предоставлены бесплатно компанией Tecno[®] Dental (Турин, Италия).

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Tan, W.L.; Wong, T.L.T.; Wong, M.C.M.; Lang, N.P. A Systematic Review of Post-extraction Alveolar Hard and Soft Tissue Dimensional Changes in Humans. *Clin. Oral Implant. Res.* **2012**, *23*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Atieh, M.; Alsabeeha, N.; Payne, A.; Ali, S.; Faggion, C.J.; Esposito, M. Interventions for Replacing Missing Teeth: Alveolar Ridge Preservation Techniques for Dental Implant Site Development. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2021**, *2021*, CD010176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Iocca, O.; Farcomeni, A.; Pardiñas Lopez, S.; Talib, H.S. Alveolar Ridge Preservation after Tooth Extraction: A Bayesian Network Meta-Analysis of Grafting Materials Efficacy on Prevention of Bone Height and Width Reduction. *J. Clin. Periodontol.* **2017**, *44*, 104–114. [[CrossRef](#)]
4. Canullo, L.; Del Fabbro, M.; Khijmatgar, S.; Panda, S.; Ravidà, A.; Tommasato, G.; Sculean, A.; Pesce, P. Dimensional and Histomorphometric Evaluation of Biomaterials Used for Alveolar Ridge Preservation: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Clin. Oral Investig.* **2022**, *26*, 141–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Araújo, M.G.; Hürzeler, M.B.; Dias, D.R.; Matarazzo, F. Minimal Invasiveness in the Alveolar Ridge Preservation, with or without Concomitant Implant Placement. *Periodontology 2000* **2023**, *91*, 65–88. [[CrossRef](#)]
6. Avila-Ortiz, G.; Chambrone, L.; Vignoletti, F. Effect of Alveolar Ridge Preservation Interventions Following Tooth Extraction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Periodontol.* **2019**, *46* (Suppl. S21), 195–223. [[CrossRef](#)]
7. Willenbacher, M.; Al-Nawas, B.; Berres, M.; Kämmerer, P.W.; Schiegnitz, E. The Effects of Alveolar Ridge Preservation: A Meta-Analysis. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2016**, *18*, 1248–1268. [[CrossRef](#)]
8. Sweeney, S.M.; DiLullo, G.; Slater, S.J.; Martinez, J.; Iozzo, R.V.; Lauer-Fields, J.L.; Fields, G.B.; Antonio, J.D.S. Angiogenesis in Collagen I Requires A2β1 Ligation of a GFP*GER Sequence and Possibly P38 MAPK Activation and Focal Adhesion Disassembly. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30516–30524. [[CrossRef](#)]
9. Rombouts, C.; Jeanneau, C.; Camilleri, J.; Laurent, P.; About, I. Characterization and Angiogenic Potential of Xenogeneic Bone Grafting Materials: Role of Periodontal Ligament Cells. *Dent. Mater. J.* **2016**, *35*, 900–907. [[CrossRef](#)]
10. Miyauchi, Y.; Izutani, T.; Teranishi, Y.; Iida, T.; Nakajima, Y.; Xavier, S.P.; Baba, S. Healing Patterns of Non-Collagenated Bovine and Collagenated Porcine Xenografts Used for Sinus Floor Elevation: A Histological Study in Rabbits. *JFB* **2022**, *13*, 276. [[CrossRef](#)]

11. Abdelgawad, M.E.; S e, K.; Andersen, T.L.; Merrild, D.M.H.; Christiansen, P.; Kj ersgaard-Andersen, P.; Delaisse, J.-M. Does Collagen Trigger the Recruitment of Osteoblasts into Vacated Bone Resorption Lacunae during Bone Remodeling? *Bone* **2014**, *67*, 181–188. [[CrossRef](#)]
12. Kim, D.; Lee, B.; Thomopoulos, S.; Jun, Y.-S. The Role of Confined Collagen Geometry in Decreasing Nucleation Energy Barriers to Intrafibrillar Mineralization. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 962. [[CrossRef](#)]
13. Mijiritsky, E.; Ferroni, L.; Gardin, C.; Bressan, E.; Zanette, G.; Piattelli, A.; Zavan, B. Porcine Bone Scaffolds Adsorb Growth Factors Secreted by MSCs and Improve Bone Tissue Repair. *Materials* **2017**, *10*, 1054. [[CrossRef](#)]
14. Jeanneau, C.; Le Fournis, C.; About, I. Xenogeneic Bone Filling Materials Modulate Mesenchymal Stem Cell Recruitment: Role of the Complement C5a. *Clin. Oral Invest.* **2020**, *24*, 2321–2329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tran-Hung, L.; Laurent, P.; Camps, J.; About, I. Quantification of Angiogenic Growth Factors Released by Human Dental Cells after Injury. *Arch. Oral Biol.* **2008**, *53*, 9–13. [[CrossRef](#)]
16. Senger, D.R.; Claffey, K.P.; Benes, J.E.; Perruzzi, C.A.; Sergiou, A.P.; Detmar, M. Angiogenesis Promoted by Vascular Endothelial Growth Factor: Regulation through $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Integrins. *Cell Biol.* **1997**, *94*, 13612–13617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wozney, J.M.; Rosen, V.; Celeste, A.J.; Miotsock, L.M.; Whitters, M.J.; Kriz, R.W.; Hewick, R.M.; Wang, E.A. Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activities. *Science* **1988**, *242*, 1528–1534. [[CrossRef](#)]
18. Cho, T.-J.; Gerstenfeld, L.C.; Einhorn, T.A. Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor Beta Superfamily during Murine Fracture Healing. *J. Bone Miner. Res.* **2002**, *17*, 513–520. [[CrossRef](#)]
19. Kishigami, S.; Mishina, Y. BMP Signaling and Early Embryonic Patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, *16*, 265–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. He, J.-Y.; Zheng, X.-F.; Jiang, S.-D.; Chen, X.-D.; Jiang, L.-S. Sympathetic Neuron Can Promote Osteoblast Differentiation through BMP Signaling Pathway. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 1372–1378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Liu, Z.; Yuan, X.; Fernandes, G.; Dziak, R.; Ionita, C.N.; Li, C.; Wang, C.; Yang, S. The Combination of Nano-Calcium Sulfate/Platelet Rich Plasma Gel Scaffold with BMP2 Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells Promotes Bone Regeneration in Rat Critical-Sized Calvarial Defects. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 122. [[CrossRef](#)]
22. White, A.P.; Vaccaro, A.R.; Hall, J.A.; Whang, P.G.; Friel, B.C.; McKee, M.D. Clinical Applications of BMP-7/OP-1 in Fractures, Nonunions and Spinal Fusion. *Int. Orthop.* **2007**, *31*, 735–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Peng, H.; Usas, A.; Olshanski, A.; Ho, A.M.; Gearhart, B.; Cooper, G.M.; Huard, J. VEGF Improves, Whereas sFlt1 Inhibits, BMP2-Induced Bone Formation and Bone Healing Through Modulation of Angiogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **2005**, *20*, 2017–2027. [[CrossRef](#)]
24. Ignatius, A.; Ehrnthaller, C.; Brenner, R.E.; Kreja, L.; Schoengraf, P.; Lisson, P.; Blakytyn, R.; Recknagel, S.; Claes, L.; Gebhard, F.; et al. The Anaphylatoxin Receptor C5aR Is Present during Fracture Healing in Rats and Mediates Osteoblast Migration In Vitro. *J. Trauma* **2011**, *71*, 952–960. [[CrossRef](#)]
25. Barone, A.; Ricci, M.; Romanos, G.E.; Tonelli, P.; Alfonsi, F.; Covani, U. Buccal Bone Deficiency in Fresh Extraction Sockets: A Prospective Single Cohort Study. *Clin. Oral Implant. Res.* **2015**, *26*, 823–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zheng, M.; Weng, M.; Zhang, X.; Li, R.; Tong, Q.; Chen, Z. Beta-Tricalcium Phosphate Promotes Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells through Macrophages. *Biomed. Mater.* **2021**, *16*, 025005. [[CrossRef](#)]
27. Giuliani, A.; Iezzi, G.; Mazzoni, S.; Piattelli, A.; Perrotti, V.; Barone, A. Regenerative Properties of Collagenated Porcine Bone Grafts in Human Maxilla: Demonstrative Study of the Kinetics by Synchrotron Radiation Microtomography and Light Microscopy. *Clin. Oral Invest.* **2018**, *22*, 505–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Di Tinco, R.; Consolo, U.; Pisciotta, A.; Orlandi, G.; Bertani, G.; Nasi, M.; Bertacchini, J.; Carnevale, G. Characterization of Dental Pulp Stem Cells Response to Bone Substitutes Biomaterials in Dentistry. *Polymers* **2022**, *14*, 2223. [[CrossRef](#)]
29. Comuzzi, L.; Tumedei, M.; Piattelli, A.; Tartaglia, G.; Del Fabbro, M. Radiographic Analysis of Graft

Dimensional Changes in Transcrestal Maxillary Sinus Augmentation: A Retrospective Study. *Materials* **2022**, *15*, 2964. [[CrossRef](#)]

Отказ от ответственности/Примечание издателя: Заявления, мнения и данные, содержащиеся во всех публикациях, принадлежат исключительно отдельному автору(ам) и соавторам(ам), а не MDPI и/или редактору(ам). MDPI и/или редактор(ы) не несут ответственности за любой вред людям или имуществу, возникший в результате любых идей, методов, инструкций или продуктов, упомянутых в содержании.