

К ВОПРОСУ О МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОСТЕОБЛАСТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ МАТЕРИАЛАМИ ПРИ ОСТЕОПЛАСТИКЕ

Т.Н. Медведева, В.В. Россинская, Л.Н. Кулагина, Л.Т. Волова*

Самарский государственный медицинский университет, Научно-исследовательский институт биотехнологий,
443079, Самара, ул. Чапаевская, 89; *e-mail: tatjana.medv@rambler.ru

В статье обсуждаются молекулярно-генетические механизмы восстановительных процессов в костной ткани при имплантации биологических материалов. Адгезия остеобластов на биологических материалах является ключевым этапом в передаче физико-химических сигналов из биоматериалов в остеобласты. Клетки костной ткани вначале взаимодействуют с биологическим материалом опосредованно, через специфические белки внеклеточного матрикса, особенно витронектин, фибронектин и коллаген I типа. В течение нескольких секунд, опережая прямой контакт остеобластов с имплантатом, белки крови могут сорбироваться на поверхности биологического материала. Именно образование «белкового слоя» на имплантатах благоприятствует адгезии остеобластов. Остеобласты соединяются с белками крови с помощью специфической последовательности RGD, трипептида Arg-Gly-Asp, характерного для витронектина, фибронектина, коллагена I типа, остеопонтина, костного сиалопротеина, тромбоспондина. Связанные с интегринами сигнальные пути могут быть разделены на два типа: сигнальные пути, зависящие от комплекса Src-FAK, и сигнальные пути, независимые от комплекса Src-FAK. Различные сайты фосфорилирования молекулы FAK могут инициировать ряд путей, включая путь PI3K/Akt/mTOR, путь Ras/MAPK/ERK1/2 и путь p130Cas-RhoA GTPаза. Для сигнальных путей, действие которых активируется вне зависимости от комплекса Src-FAK, важным регуляторным фактором является интегрин-связанная киназа (ILK). Среди других важных клеточных мембранных белков кадерины могут также служить сигнальными молекулами трансдукции, вовлеченными в регуляцию важных клеточных активностей. Таким образом, помимо физического прикрепления остеобластов к биоматериалам клеточная адгезия приводит к активации нескольких сигнальных путей, среди которых связанные с интегринами и кадгеринами сигнальные пути являются наиболее важными.

Ключевые слова: остеобласты; клеточная адгезия; активация репаративных процессов; сигнальные пути и каскады ферментативных реакций

DOI: 10.18097/BMCRM00262

ВВЕДЕНИЕ

Костнопластические материалы уже давно успешно используются в медицинской практике с целью активации репаративных процессов и ускорения восстановления структуры и функции кости. Значительное число работ, появившихся в последнее время и имеющих отношение к разработке проблем восстановительных процессов в костной ткани при замещении дефектов биологическими пластическими материалами, в той или иной степени направлено на изучение внутриклеточных событий, лежащих в основе морфологических изменений. Акцент исследований в этой области смещается в направлении изучения молекулярно-генетических механизмов, собственно и определяющих процессы регенерации.

Становится все более очевидным, что адгезия остеобластов на биологических материалах является ключевым этапом в передаче физико-химических сигналов из биоматериалов в остеобласты, тем самым инициируя каскад остеointеграции и регулируя взаимодействия между остеобластами и биологическими материалами (рис. 1) [1-3].

Установлено, что остеобласты вначале взаимодействуют с биологическим материалом опосредованно через специфические белки внеклеточного матрикса (extra-cellular

matrix–ECM), особенно витронектин, фибронектин и коллаген I типа [4] (рис. 2). Немедленно, в течение нескольких секунд, опережая прямой контакт остеобластов с имплантатом, белки ECM крови могут сорбироваться на поверхности биологического материала [5]. Благодаря слабым физико-химическим взаимодействиям (водородным связям, ван-дер-ваальсовым взаимодействиям, электростатическим силам) между поверхностными молекулами подложки и белками возникает так называемый экстраматериальный матрикс [4-5]. Из белков ECM крови на биологических материалах обнаруживают также альбумин, фибриноген, иммуноглобулины и ряд других. Таким образом, именно образование «белкового слоя» на имплантатах способствует адгезии остеобластов [6].

Остеобласты соединяются с белками ECM с помощью специфической последовательности RGD – трипептида Arg-Gly-Asp, характерного для витронектина, фибронектина, коллагена I типа, остеопонтина, костного сиалопротеина, тромбоспондина. RGD-последовательность является основным лигандом, который взаимодействует с мембранными белками остеобластов (в основном интегринами), обеспечивая клеточную адгезию [5, 7].

Передаваемые через интегрины сигналы могут затем активировать первоначальную сборку ряда



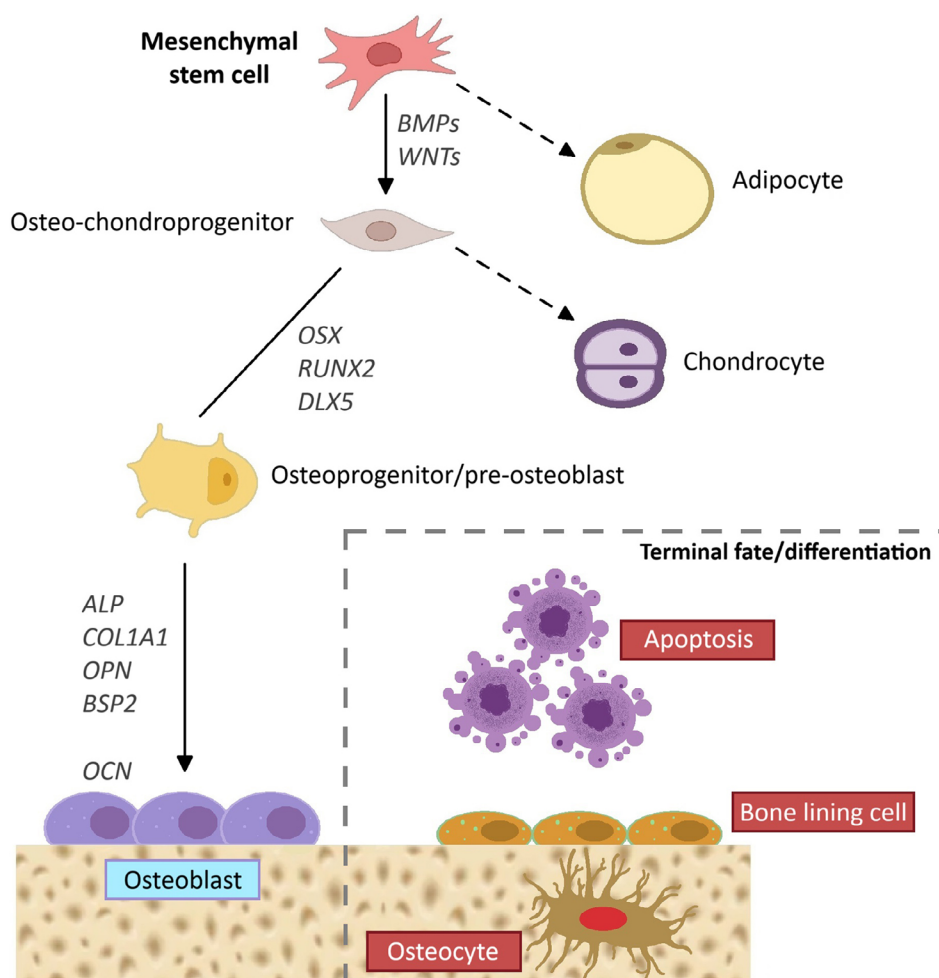


Рисунок 1. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Возможные пути дифференцировки МСК. Развитие остеобластов и появление остеоцитов [23].

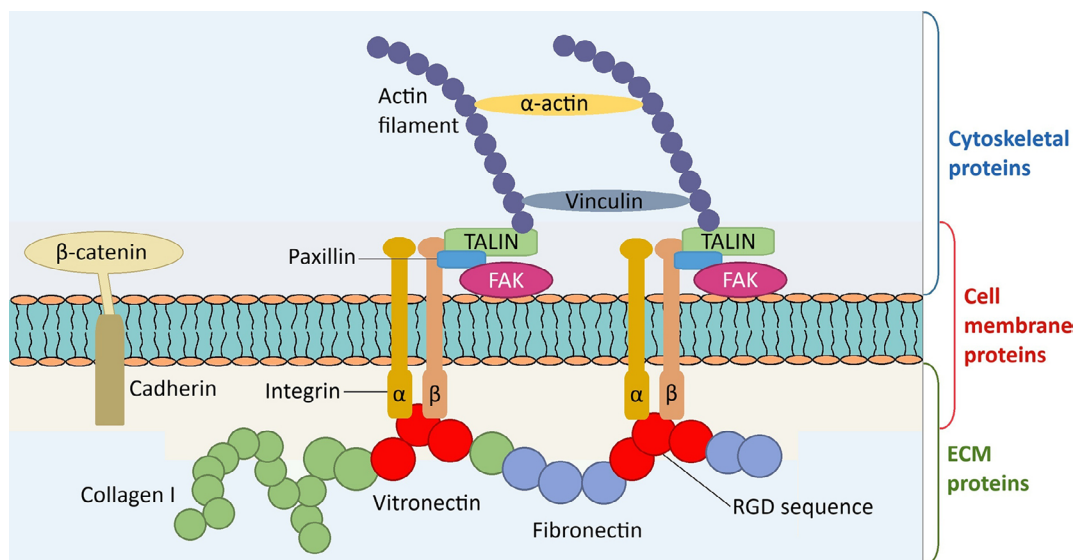


Рисунок 2. Белки адгезии остеобластов. Белки ECM в основном состоят из коллагена I типа, витронектина и фибронектина, которые имеют специфическую последовательность RGD. Интегрины и кадерины являются трансмембранными белками с внеклеточным доменом, связывающим лиганды, а также внутриклеточным доменом, связанным с белками цитоскелета. Белки цитоскелета, включая FAK, талины, винкулины, β-катенин и актины, представляют собой набор взаимосвязанных молекул, которые вместе способствуют формированию фокальных пластинок (адаптировано из [4]).

белков цитоскелета. Цитоскелетные белки клеточной адгезии остеобластов высокоорганизованы как сеть взаимосвязанных белков вблизи периферии клеток и образуют так называемые фокальные пластинки. Такие

пластинки обеспечивают сильную адгезию к биологическим материалам и состоят из набора молекул, включая талины, киндлин, винкулин, α-актин, интегрин-связанную киназу (ILK), а также киназу фокальной адгезии (FAK) [8].

Созревание фокальных пластинок может со временем окончательно стабилизировать остеобласты на поверхностях биологических материалов и трансдуцировать сигналы в цитоскелетную сеть и ядро [9].

1. ТРАДИЦИОННЫЕ ПУТИ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

1.1. Сигнальные пути, связанные с интегрином

Связанные с интегрином сигнальные пути могут быть разделены на два типа: сигнальные пути, зависящие от комплекса Src-FAK, и сигнальные пути, не зависящие от комплекса Src-FAK.

Сигнальные пути, зависящие от комплекса Src-FAK

Было показано, что взаимодействия клеток с ECM могут активировать Src, связывать тирозинкиназу с цитоплазматическим хвостом интегрин через SH2-домены и далее модулировать фосфорилирование фокальной адгезионной киназы (FAK), что в комплексе играет центральную роль в нескольких сигнальных путях [10]. Различные сайты фосфорилирования молекулы FAK могут инициировать ряд путей, включая путь PI3K/Akt/mTOR, путь Ras/MAPK/ERK1/2 и путь p130Cas-RhoA GTPаза.

PI3K/Akt/mTOR сигнальный путь. Это внутриклеточный сигнальный путь, главными компонентами которого являются ферменты: фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), протеинкиназа B (PKB), также известная как Akt, и киназа mTOR. Играет роль единого универсального механизма передачи пролиферативного сигнала на аппарат трансляции, ответственного в клетках за интеграцию пролиферативных стимулов и одновременную активацию трансляции. Рецепторные тирозинкиназы (RTK), экстрацеллюлярные домены которых связываются с лигандом, активируют PI3K I класса. Фосфорилирование сайтов Tyr397 FAK может затем создать домен SH2 и рекрутировать субъединицу p85 PI3K. Вслед за этим PI3K фосфорилирует Akt с помощью PDK-1, что приводит к активации комплекса mTOR 1 (mTORC1). Akt активирует mTOR-комплекс 1 (mTORC1) с помощью многозонного фосфорилирования TSC2 в комплексе TSC1-TSC2, и это блокирует способность TSC2 действовать как GTPазу-активирующий белок (GAP, GTPase activating protein) для Rheb, что позволяет накапливать Rheb-GTP. Rheb-GTP активирует mTORC1, который фосфорилирует нижестоящие мишени, такие как 4E-BP1, и гидрофобную последовательность на S6-киназах. mTORC1 регулирует иницирование трансляции и биогенез рибосом на S6K1 и 4E-BP1, что усиливает адгезию и пролиферацию остеобластов [11].

В дополнение к своей относительно прямой роли в формировании кости через mTOR, Akt представляет собой киназу семейства AGC, которая также может фосфорилировать другие семейства субстратов, что имеет решающее значение для формирования кости. Среди них группа транскрипционных факторов Forkhead (FOXO). Эти транскрипционные факторы не специфичны для остеобластов в отличие от других ядерных факторов, таких как RUNX2, OSTERIX и ATF4. Именно транскрипционные семейства FOXO1, FOXO3 и FOXO4 группы Forkhead

высоко экспрессируются в хондроцитах и остеобластах. Активированная киназа Akt может фосфорилировать FOXO и контролировать их транскрипционную активность, сохраняя их в цитоплазме и не способствуя их транспорту в ядро. Кроме того, Akt в сочетании с костным морфогенетическим белком 2 (BMP2) опосредует дифференцировку остеобластов из мезенхимальных стромальных клеток [12].

Ras-MAPK/ERK1/2 сигнальный путь. Первичный сигнальный путь, связанный с комплексом Src-FAK, регулирует выживаемость, пролиферацию и дифференцировку остеобластов. После активации посредством интегринов фосфорилирование сайтов Tyr925 комплекса Src/FAK может обеспечить связывание комплекса Grb2-SOS и индуцировать преобразование Ras-GDP в Ras-GTP [13]. Активация Ras может способствовать экспрессии таких белков ECM, как фибронектин, витронектин и коллаген I типа. Экспрессия осуществляется через активацию экстрацеллюлярной сигнальной киназы 2 (ERK2) [14]. По данным Ge и соавт., фосфорилирование FAK ведет к фосфорилированию и активации RUNX2 – ключевого транскрипционного фактора в остеобластах [15]. Введение RUNX2 в мезенхимальные стволовые клетки стимулирует дифференцировку остеобластов. Напротив, сверхэкспрессия RUNX2 в остеобластах с коллагеновыми позициями типа I блокирует терминальную дифференцировку и увеличивает резорбцию кости. Эти данные показывают, что RUNX2 необходим для спецификации линии остеобластов из мезенхимальных предшественников, но уровни RUNX2 должны быть жестко отрегулированы в костных клетках [16].

Сигнальный путь p130Cas-RhoA GTP-аза. Было также обнаружено, что комплекс Src-FAK может влиять на структуру цитоскелета и морфологию клеток и дополнительно регулировать адгезию, распространение и полярность клеток остеобластов. Обогащенные пролином области (PPR) опосредуемого интегрином комплекса Src/FAK могут связывать белки, содержащие домен Src homology-3 (SH3), такие как p130 Crk-ассоциированный субстрат (p130Cas), что приводит к активации RhoA-GTPазы и способствует сокращению клеток, регулируя реорганизацию цитоскелета [17].

Сигнальные пути, не зависящие от комплекса Src-FAK

Помимо этого существуют сигнальные пути, действие которых активируется вне зависимости от комплекса Src-FAK. Для подобных сигнальных путей важным регуляторным фактором является ILK [18]. Клеточно-матричные взаимодействия в основном опосредуются интегринными, которые распознают и связывают специфические субстраты (например, фибронектин и коллаген I типа) и передают информацию от ECM внутрь клетки. Связывание лиганда с интегринными приводит к образованию высокодинамичных комплексов прикрепления ECM, называемых комплексами фокальной адгезии (FA), состоящими из каркасных белков, актиновых филаментов и сигнальных белков. Среди белков, которые образуют FA и тем самым структурно и функционально связывают интегрин с актиновым цитоскелетом, выявляются киназа фокальной адгезии (FAK) и киназа, связанная с интегрином (ILK). В отличие от FAK роль ILK менее охарактеризована. Известно, что

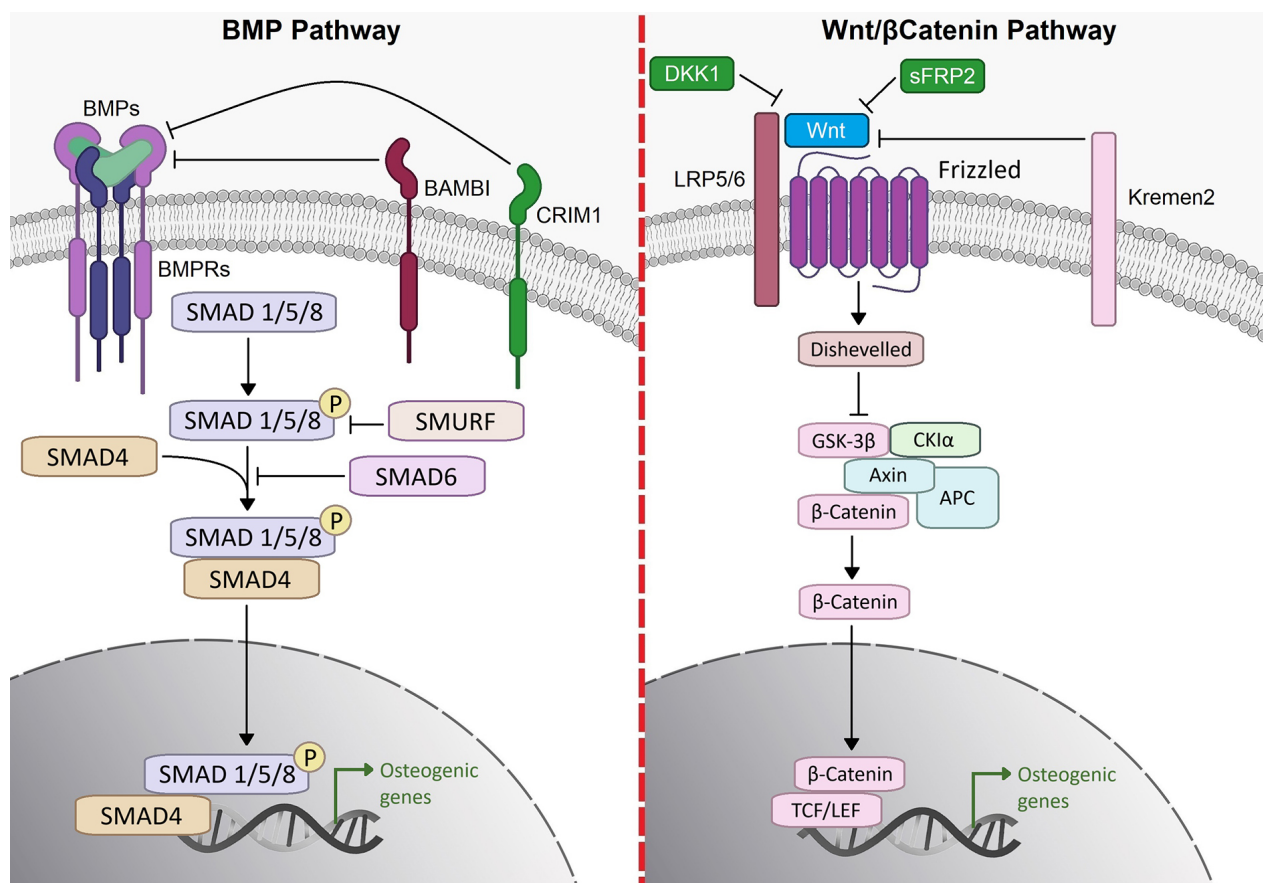


Рисунок 3. Традиционные пути остеогенной дифференцировки. Рисунок показывает два классических пути остеогенной дифференцировки МСК/преостеобластов, т. е. путь морфогенеза костей и путь Wnt/β-катенин. BMPRs — рецепторы BMP; BAMBI — гомолог ингибитора BMP и активина, связанный с мембраной; CRIM1 — обогащенный цистеином белок 1 двигательных нейронов; SMAD — факторы транскрипции; DKK1 — белок семейства Dkk 1, специфически подавляющий активность Wnt/β-катенин пути и осуществляющий контроль над клеточной дифференцировкой; sFRP2 — секретируемый белок, ключевой регулятор передачи сигналов Wnt, родственного рецептору frizzled 2; Kremen — трансмембранные белки, содержащие домен Крингла, идентифицированные рецепторы Dkk1 и Dkk2; LRP — белок, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности, LRP5 и LRP6 (LRP 5/6) - белки плазматической мембраны, рецепторы Dkk1 и Dkk2; GSK — киназа гликогенсинтазы; CKIα — казеинкиназа Ia; APC — белок аденоматозного полипоза толстой кишки, компонент белкового комплекса «деструкции» пути Wnt/β-катенин; TCF/LEF — фактор Т-клеток/фактор связывания лимфоидного энхансера [23]. В ядре β-катенин активирует факторы транскрипции (Т-клеточный фактор/ лимфоидный фактор приводят к активации экспрессии генов мишеней).

ILK связывает цитоплазматические домены субъединиц интегрина β1 и β3 и служит каркасом для некоторых других компонентов комплекса FA, которые взаимодействуют с актином. В клеточной адгезии, опосредованной интегрином, ILK сочетает как структурные, так и сигнальные функции. Соединяя интегрин с актином, ILK проявляет свойства молекулы-адаптера, образуя тройной комплекс с парвином и богатым цистеином и гистидином белком PINCH. Этот комплекс получил название IPP (ILK-PINCH-parvin). В опытах *in vitro* показано, очищенная ILK функционирует как киназа серин/треонинового типа, регулирующая фосфорилирование киназа-гликоген-синтазы -3β (GSK-3β) (по Ser9) и протеинкиназы B/Akt) (по Ser473) [18].

1.2. Кадгерин/катенин – сигнальные пути

В качестве других важных клеточных мембранных белков кадгерина могут также служить сигнальными молекулами трансдукции (рис. 3) и опосредуют несколько важных клеточных активностей. Хорошо известно, что связь β-катенина с цитоплазматическими доменами кадгеринов играет ключевую роль в сигнальных путях, связанных с кадгеринами [19]. Сверхэкспрессия

N-кадгерина ингибирует остеогенную дифференцировку МСК посредством негативной регуляции сигнальных путей β-катенина и ERK1/2. Основным механизмом ингибирования остеогенеза N-кадгерином может заключаться в подавлении сигнальных путей β-катенина и ERK1/2, что приводит к уменьшению транслокации β-катенинов в ядро [19]. Также было обнаружено, что кадгерин-2 подавляет канонические сигнальные пути Wnt (жизненно важные для остеогенной дифференцировки) из-за удержания β-катенина в цитоплазме остеобластов [20-21]. По современным представлениям β-катенин – это белок, участвующий в клеточной адгезии и в регуляции экспрессии генов. В клеточной адгезии β-катенин выполняет свои функции, соединяя цитоплазматическую часть кадгерина с α-катенином и F-актином. При регуляции экспрессии генов β-катенин выступает в качестве внутриклеточного передатчика сигнала в сигнальном пути Wnt, играющем важную роль в эмбриональном развитии и гомеостазе тканей [22].

Таким образом, помимо осуществления физического прикрепления остеобластов к биоматериалам, клеточная адгезия также приводит к активации нескольких сигнальных путей, из которых связанные с интегринными и кадгеринными сигнальные пути являются наиболее важными. В то

время как сигнальные пути, связанные с интегринами, всегда оказывают положительное влияние на процессы адгезии остеобластов, сигнальные пути кадгерина могут подавлять сигнальные пути Wnt/ β -катенин и ингибировать дифференцировку остеобластов. Это свидетельствует о том, что адгезия остеобластов играет центральную роль в иницировании раннего каскада остеointеграции путем регулирования задействованных путей передачи сигналов клеток, определяя исход ранней остеointеграции.

2. РОЛЬ РНК В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ОСТЕОБЛАСТОВ

Хотя на сегодняшний день многое известно о классических путях детерминации и терминальной дифференцировки остеобластов, существует ряд новых способов, с помощью которых этот процесс контролируется и настраивается в соответствии с постоянно меняющимися потребностями организма. Они обобщены в обзорной работе [23], в которой приводятся данные о различных типах РНК, оказывающих влияние на процессы дифференцировки остеобластов.

Некодирующая РНК (нкРНК) – это общий термин, относящийся к любой РНК, которая не транслируется в белок. Гены, кодирующие эти виды РНК, находятся в неэкзонной области генома, которая составляет подавляющую часть генетического материала сложных организмов. За прошедшие годы было открыто множество различных семейств нкРНК, включая микроРНК (miRNA), длинные некодирующие РНК (lncRNA), малые ядерные РНК (minRNA), малые ядерные РНК (minsRNA) и недавно открытые кольцевые РНК (circRNAs). В дифференцировке остеобластов участвуют miRNAs, lncRNAs и circRNAs.

Наиболее полно охарактеризован класс молекул miRNA, которые в среднем состоят из 22 нуклеотидов и появляются в результате транскрипции специфических последовательностей ДНК, кодирующих более длинный первичный предшественник, который затем процессируется в предшественник miRNA. Сообщается, что некоторые miRNAs оказывают влияние на BMP и Wnt пути дифференцировки остеобластов, тем самым нарушая или благоприятствуя дифференцировке [24]. Так, семейство miR-29, а именно miR-29a и miR-29b, увеличивается во время остеобластогенеза, тем самым способствуя формированию кости на ранних этапах за счет подавления ключевых ингибиторов пути Wnt [25]. Показано также, что во время индуцированной BMP-2 остеогенной дифференцировки miR-133 и miR-135 подавляются, что приводит к ингибированию ключевых проостеогенных факторов RUNX2 и SMAD5, причем SMAD5 является ключевой молекулой в передаче сигналов BMP. Двумя другими важными miRNAs, которые регулируют путь RUNX2, являются miR-2861 и miR-3960. Первый воздействует на гистондеацетилазу HDAC5, снижение активности которой приводит к повышенному накоплению RUNX2. Аналогичный эффект был выявлен для miR-3960, которая действует на репрессор RUNX2 Homeobox A2 (HOXA2). Другим непрямым регулятором RUNX2 является miR-15b, которая воздействует на SMAD Ubiquitination Regulatory Factor 1 (SMURF1) (регуляторный фактор убиквитинирования), предотвращая убиквитинирование RUNX2. Ряд miRNAs непосредственно влияют на

RUNX2, тем самым способствуя снижению остеогенной дифференцировки. Ключевые примеры: miR-338-3p и miR-637 [26]. Совершенно другой транскрипт, который, однако, приводит к сходным эффектам, является мишенью miR-138: киназа FAK.

Длинные некодирующие РНК содержат от 200 до более 10000 нуклеотидов. Значительная длина таких РНК позволяет им быть универсальными молекулами с описанными функциями, простирающимися от контроля транскрипции и трансляции мРНК, посттрансляционных модификаций до определения структуры хроматина [27]. Они могут также предоставлять сайты связывания для специфических miРНК. Хотя это семейство РНК менее изучено, чем miRNAs, в последние несколько лет появились сообщения, предполагающие роль этого класса в дифференцировке остеобластов [28]. Так, например, новая lncRNA, названная lncRNA-1, способствует дифференцировке остеобластов, приводя к активации нескольких основных регуляторов остеогенеза, включая RUNX2 и SP7. РНК 111050 является еще одним особенно интересным примером, способным усиливать остеогенную дифференцировку MCK за счет активации нескольких ключевых факторов, в том числе OCN, COL 1A2, OPN и RUNX2. Примечательна также lncРНК HOTAIR: уровни ее экспрессии снижены при BMP-2-индуцированной остеогенной дифференцировке, а ее избыточная экспрессия снижает экспрессию RUNX2 и COL1A1 [29-31]. Область исследования относительно молекул, и lncRNAs являются особенно сложными для изучения молекулами; тем не менее, к настоящему времени было получено несколько результатов, связанных с их ролью в остеогенной дифференцировке, и мы ожидаем, что эта область будет расширяться в ближайшем будущем [32].

CircRNAs, в отличие от других ncRNAs, обычно возникают в результате альтернативного сплайсинга кодирующих мРНК, которые ковалентно связаны на 3'- и 5'-концах [33]. Хотя механизм действия большинства circRNAs до сих пор неясен, некоторые из них проявляют явные проостеогенные эффекты [34]. Примером может служить hsa-circ0074834, способствующая заживлению костных дефектов [34]. Недавно было показано, что компонент 3 комплекса поддержания минихромосомы, включающий circRNAs (circMCM3AP) и O-маннозилтрансфераза 1 (circ POMT 1), способствует остеогенезу посредством передачи сигналов BMP по механизму, который, по-видимому, зависит от RUNX2, COL 1 и miR-6881-3p [35].

Большинство ncРНК, описанных к настоящему времени, влияют на экспрессию одного или нескольких ключевых генов дифференцировки остеобластов, что объясняет их влияние на этот процесс [28]. В литературе отсутствуют данные, позволяющие рассматривать этапы имплантации и реакцию костной ткани при остеопластике на примере различных семейств РНК. Однако, предполагая в перспективе появление и расширение исследований о роли РНК в постимплантационном остеогенезе, мы достаточно подробно остановились на вопросе связи известных семейств РНК и дифференцировки остеобластов.

Таким образом, прикрепление клеток на поверхности биологических материалов, используемых для имплантации, оказывает заметное влияние на успешное восстановление кости. Поверхности биологических материалов генерируют сигналы, которые могут быть распознаны и трансдуцированы посредством трансмембранных факторов адгезии внутрь

клетки. Благодаря такому механизму генерируемые сигналы затем активируют ряд транскрипционных факторов для регулирования родственного гена и экспрессии белка.

3. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Разрабатываемая в Научно-исследовательском институте биотехнологий Самарского государственного медицинского университета программа комплексного изучения костнопластических материалов включает изучение морфологических характеристик, химического состава, микроструктурных и биохимических свойств, адгезии клеток к их поверхности. Исследования показали, что технологии, используемые при производстве костнопластических материалов в «Лиопласт»^Т, обеспечивают сохранение полного комплекса биологически активных компонентов используемых тканей, что способствует созданию оптимальных условий для генетически запрограммированной физиологической регенерации в организме человека [36].

Микроструктурные и биохимические свойства таких материалов анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии, микрокомпьютерной томографии, рамановской спектроскопии и протеомного анализа. Свойство клеточной адгезии имплантатов оценивали с использованием клеточных культур и флуоресцентной микроскопии.

Микроструктурный анализ выявил иерархическую пористую структуру материала с полным удалением клеточного дебриса и компонентов костного мозга. Протеомный анализ подтвердил сохранение коллагена и внеклеточных белков, стимулирующих и ингибирующих клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку. Спектроскопия комбинационного рассеяния позволила установить, что коллаген является основным белковым компонентом имплантатов и образует фибриллярный каркас костного матрикса. Протеомный анализ деминерализованной губчатой ткани человека показал наличие коллагена и белков внеклеточного матрикса. Выявлены пять основных типов коллагена (I, IV, VI, XII, XIV), фибронектин, витронектин, остеопонтин, матричный Gla-белок, трансформирующий фактор роста TGF- β 1, мимекан, костный сиалопротеин 2 и ряд других белков в органическом матриксе спонгиозы человека [36]. Костные имплантаты, таким образом, могут служить источником биологически активных соединений, важных для ранней остеоинтеграции. Молекулярная и редуцированная формы коллагена в имплантате в таком случае могут проявлять себя как сигнальные молекулы, запускающие каскады ферментативных реакций и внутриклеточные сигнальные пути [37]. Использование масс-спектрометрического анализа позволило также выявить в составе получаемых костнопластических материалов ДНК - связывающие транскрипционные факторы (белки цинковых пальцев 267, 394, 585) и РНК - связывающий белок ELAVL3, стабилизирующий мРНК; эти белки принимают участие в клеточной дифференцировке [38]. Наряду с этим обнаружен репрессор транскрипции CRY1, являющийся главным компонентом циркадных часов. Циркадные часы регулируют различные физиологические процессы путем генерации 24-часовых ритмов генной экспрессии, влияя на особенности метаболизма и

поведения. Регулятор комплексов гистонметилтрансферазы JARID2 участвует в дифференцировке стволовых клеток и нормальном эмбриогенезе, включая сердце, развитие нервной трубки и кроветворение. Мембранный рецептор коллагена, интегральный трансмембранный гликопротеин интегрин альфа-10 Integrin alpha-10 ITGA10, состоящий из нековалентно связанных α - и β -цепей, участвует в клеточной адгезии, а также в опосредованной поверхностью клеток передаче сигнальной информации. Дифференциальный характер экспрессии интегрин опосредован факторами роста и дифференциации[38].

Результаты выполненных исследований свидетельствуют о наличии в составе исследуемых аллогенных костнопластических материалов важных компонентов, обеспечивающих синтетические процессы и клеточную дифференцировку, которые служат основой для проявления функциональной активности костной ткани.

Изучение состава и функциональных особенностей пластических материалов позволяет вывести подобные исследования на новый уровень – создание модели взаимодействия имплантат-костная ткань.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ogle, O.E. (2015) Implant surface material, design, and osseointegration. *Dent. Clin. North Am.*, **59**(2), 505-520. DOI: 10.1016/j.cden.2014.12.003
2. Chen, Ni, S., Han, S., Crauford, R., Lu, S., Wei, F., Chang, J., Wu, C., Xiao, Y. (2017) Nanoporous microstructures mediate osteogenesis by modulating the osteo-immune response of macrophages. *Nanoscale*, **9**(2), 706-718. DOI: 10.1039/c6nr06421c
3. Chen, Z., Bachhuka, A., Wei, F., Wang, X., Liu, G., Vasilev, K., Xiao, Y. (2017) Nanotopography-based strategy for the precise manipulation of osteoimmunomodulation in bone regeneration. *Nanoscale*, **9**(46), 18129-18152. DOI: 10.1039/c7nr05913b
4. Chen, Sh., Guo, Y., Liu, R., Wu, S., Fang, J., Huang, B., Li, Z., Chen, Zh., Chen, Z. (2018) Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. *Coll. and Surf. B: Biointerfaces*, **164**, 58-69. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.01.022
5. Vagaska, B., Bacakova, L., Filova, E., Balik, K. (2010) Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiol. Res.*, **59**(3), 309-322. DOI: 10.33549/physiol.res.93.1776
6. Rico, P., Rodriguez Hernandez, J.C., Moratal, D., Altankov, G., Monleon, P.M., Salmeronsanchez, M. (2009) Substrate-induced assembly of fibronectin into networks: influence of surface chemistry and effect on osteoblast adhesion. *Tissue Eng. Part A*, **15**(11), 3271-3281. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0141
7. Hidalgo-Bastida, L.A., Cartmell, S.H. (2010) Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **16**(4), 405-412. DOI: 10.1089/ten.TEB.2009.0714
8. Zhou, J., Han, Y., Lu, S. (2014) Direct role of interred spacing in mediating cell adhesion on Sr-HA nanorod-patterned coatings. *Int. J. Nanomedicine*, **9**, 1243-1260. DOI: 10.2147/LIN.S58236
9. Khalilii, A.A., Ahmad, M.R. (2015) A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**(8), 18149-18184. DOI: 10.3390/ijms160818149

10. Kim, S.H., Turnbull, J., Guimond, S. (2011) Extracellular matrix and cell signaling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.*, **209**(2), 139–151. DOI: 10.1530/JOE-10-0377
11. Manning, B.D., Cantley, L.C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, **129**(7), 1261–1274. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.009
12. Guntur, A.R., Rosen, C.J. (2011) New insights into osteoblasts and their role in bone formation: the central role of P13 kinase. *J. Endocrinol.*, **211**(2), 123–130. DOI: 10.1530/JOE-11-0175
13. Mitra, S.K., Hanson, D.A., Schlaepfer, D.D. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**(1), 56–68. DOI: 10.1038/nrm1549
14. Jiang, T., Guo, L., Ni, S., Zhao, Y. (2015) Upregulation of cell proliferation via Shc and ERK1/2 MAPK signaling in SaOS-2 osteoblasts grown on magnesium alloy surface coating with tricalcium phosphate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **26**(4), 158. DOI: 10.1007/S10856-015-5479-2
15. Ge, C., Yang, Q., Zhao, G., Yu, H., Kirkwood, K.L., Franceschi, R.T. (2012) Interactions between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAP kinase pathways in the control of RUNX2 phosphorylation and transcriptional activity. *J. Bone Miner. Res.*, **27**(3), 538–551. DOI: 10.1002/jbmr.561.146/6842
16. Schroeder, T.M., Jensen, E.D., Westendorf, J.J. (2005) Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Research (Part C)*, **75**(3), 213–225. Wiley-Liss, Inc. DOI: 10.1002/bdrc.20043
17. Legate, K.R., Wickström, S.A., Fässler, R. (2009) Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.*, **23**(4), 397–418. DOI: 10.1101/gad.1758709
18. Dejaeger, M., Bohm, A.M., Dirckx, N., Devriese, J., Nefyodova, E., Cardoen, R., St-Arnaud, R., Tournoy, J., Luyten, F.P., Maes, C. (2017) Integrin-linked kinase regulates bone formation by controlling cytoskeletal organization and modulating BMP and Wnt signaling in osteoprogenitors. *J. Bone Miner. Res.*, **32**(10), 2087–2102. DOI: 10.1002/jbmr.3190
19. Xu, L., Meng, F., Ni, M., Lee, Y., Li, G. (2013) N-cadherin regulates osteogenesis and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol. Biol. Rept.*, **40**(3), 2533–2539. DOI: 10.1007/S11033-012-2334-0
20. Marie, P.J., Hay, E., Modrowski, D., Revollo, L., Mbalaviele, G., Civitelli, R. (2014) Cadherin-mediated cell-cell adhesion and signaling in the skeleton. *Calcif. Tissue Int.*, **94**(1), 46–54. DOI: 10.1007/S00223-013-9733-7
21. Vlashi, R., Zhang, X., Wu, M., Chen, G. (2023) Wnt signaling: essential roles in osteoblast differentiation, bone metabolism and therapeutic implications for bone and skeletal disorders. *Gene Dis.*, **10**(4), 1291–1317. DOI: 10.1016/j.gendis.2022.07.011
22. Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, Ch., Li, Yu., Zhang, X., Zhou, Zh., Shu, G., Yin, G. (2022) Wnt/ β -catenin signaling function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal transduction and targeted therapy*, **7**(1), 3. DOI: 10.1038/s41392-021-00762-6
23. Ponzetti, M., Rucci, N. (2021) Osteoblast differentiation and signaling: established concepts and emerging topics. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(13), 6651. DOI: 10.3390/ijms 22136651
24. Cech, T.R., Steitz, J.A. (2014) The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Cell*, **157**, 177–194. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.008
25. Capulli, M., Paone, R., Rucci, N. (2014) Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.*, **561**, 563–612. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.003
26. Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., Lifton, R.P. (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N. Engl. J. Med.*, **346**, 1513–1521. DOI: 10.1056/NEJMoa013444
27. Zhang, J., Hao, X., Yin, M., Xu, T., Guo, F. (2019) Long Non-Coding RNA in osteogenesis: a new world to be explored *Bone Jt. Res.*, **8**, 73–80. DOI: 10.1302/2046-3758.82.BJR-2018-0074.R1
28. Nardocci, G., Carrasco, M.E., Acevedo, E., Hodar, C., Meneses, C., Montecino, M. (2018) Identification of a novel long noncoding RNA that promotes osteoblast differentiation. *J. Cell Biochem.*, **119**, 7657–7666. DOI: 10.1002/jcb.27113
29. Zhang, W., Dong, R., Diao, S., Du, J., Fan, Z., Wang, F. (2017) Differential long noncoding RNA/mrna expression profiling and functional network analysis during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.*, **8**, 1–13. DOI: 10.1186/s13287-017-0485-6
30. Wei, B., Wei, W., Zhao, B., Guo, X., Liu, S. (2017) Long non-coding RNA HOTAIR inhibits mir-17-5p to regulate osteogenic differentiation and proliferation in nontraumatic osteonecrosis of femoral head. *PLoS One*, **12**(2), e0169097. DOI: 10.1371/journal.pone.0169097
31. Jia, J., Feng, X., Xu, W., Yang, S., Zhang, Q., Liu, X., Dai, Y.F.Z. (2014) MiR-17-5p modulates osteoblastic differentiation and cell proliferation by targeting SMAD7 in non-traumatic osteonecrosis. *Exp. Mol. Med.*, **46**. DOI: 10.1038/emm.2014.43
32. Silva, A.M., Moura, S.R., Teixeira, J.H., Barbosa, M.A., Santos, S.G., Almeida, M.I. (2019) Long noncoding RNAs: a missing link in osteoporosis. *Bone Res.*, **7**, 1–16. DOI: 10.1038/s41413-019-0048-9
33. Barrett, S.P., Salzman, J. (2016) Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development*, **143**, 1838–1847. DOI: 10.1242/dev.128074
34. Ouyang, Z., Tan, T., Zhang, X., Wan, J., Zhou, Y., Jiang, G., Yang, D., Guo, X., Liu, T. (2019) CircRNA hsa_circ_0074834 promotes the osteogenesis-angiogenesis coupling process in bone mesenchymal stem cells (BMSCs) by acting as a ceRNA for miR-942-5p. *Cell Death Dis.*, **10**. DOI: 10.1038/s41419-019-2161-5
35. Huang, X., Cen, X., Zhang, B., Liao, Y., Zhu, G., Liu, J., Zhao, Z. (2019) Prospect of circular RNA in osteogenesis: a novel orchestrator of signaling pathways. *J. Cell. Physiol.*, **234**, 21450–21459. DOI: 10.1002/jcp.28866
36. Tsiklin, I.L., Pugachev, E.I., Kolsanov, A.V., Timchenko, E.V., Boltovskaya, V.V., Timchenko, P.E., Volova, L.T. (2022) Biopolymer material from human spongiouse for regenerative medicine application. *Polymers*, **14**(5), 941. DOI: 10.3390/polym14050941
37. Medvedeva, T., Volova, L., Kulagina, L. (2023) The study of type I collagen by immunoblotting in samples of bone-plastic biomaterials. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **6**(2), e00189. DOI: 10.18097/BMCRM00189
38. Ryabov, N.A., Volova L.T., Alekseev D.G., Kovaleva S.A., Medvedeva T.N., Vlasov M.Yu. (2024) Mass spectrometry of collagen – containing allogeneic human bone tissue material. *Polymers (Basel)*, **16**(13), 1895. DOI: 10.3390/polym16131895

Поступила: 13.12.2024
 После доработки: 19.05.2025
 Принята к публикации: 22.05.2025

ON THE QUESTION OF THE MOLECULAR AND GENETIC MECHANISMS BY WHICH BONE TISSUE OSTEOBLASTS INTERACT WITH BIOLOGICAL MATERIALS DURING OSTEOPLASTY

T.N. Medvedeva, V.V. Rossinskaya, L.N. Kulagina, L.T. Volova*

Samara State Medical University, Biotech Research Institute,
89 Chapaevskaya str., Samara, 443079 Russia; *e-mail: tatjana.medv@rambler.ru

The article herein sets out to show the molecular and genetic mechanisms underpinning regenerative processes in bone tissue during the implantation of biological materials. The adhesion of osteoblasts to biological materials is a pivotal step in the transfer of physicochemical signals from biomaterials to osteoblasts. Initially, bone tissue cells interact with the biological material indirectly, through specific extracellular matrix proteins, especially vitronectin, fibronectin, and type I collagen. During the period preceding direct contact of osteoblasts with the implant, it is possible for blood proteins to be absorbed on the surface of the biological material in few seconds. Exactly the formation of a "protein layer" on the implants has been demonstrated to favour the adhesion of osteoblasts. The process of adhesion of osteoblasts to blood proteins is facilitated by a specific sequence, RGD, a tripeptide consisting of the amino acids Arg, Gly and Asp. This sequence is characteristic of vitronectin, fibronectin, type I collagen, osteopontin, bone sialoprotein and thrombospondin. Integrin-related signalling pathways can be categorised into two distinct types: those that are contingent on the Src-FAK complex and those that are not. It has been established that the phosphorylation of FAK at various sites can trigger multiple signalling pathways, including the PI3K/Akt/mTOR pathway, the Ras/MAPK/ERK1/2 pathway, and the p130Cas-RhoA GTPase pathway. For signalling pathways whose action is not contingent on the Src-FAK complex, integrin-linked kinase (ILK) is a pivotal regulatory factor. Among other significant cell membrane proteins, cadherins have been demonstrated to function as signal transduction molecules, contributing to the regulation of critical cellular activities. Consequently, in addition to the physical attachment of osteoblasts to biomaterials, cell adhesion leads to the activation of several signalling pathways, among which integrin- and cadherin-related signalling pathways are the most significant.

Key words: osteoblasts; cell adhesion; activation of reparative processes; signaling pathways and enzymatic reaction cascades

FUNDING

No external funding.

Received: 13.12.2024, revised: 19.05.2025, accepted: 22.05.2025