

СОВРЕМЕННЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА ПОЗВОНОЧНИКЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ СПОНДИЛОДЕЗА (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2018.10.4.24

УДК 616.711–002–089.844

Поступила 7.08.2018 г.



А.Е. Боков, к.м.н., зав. отделением нейрохирургии Института травматологии и ортопедии;
С.Г. Млявых, к.м.н., руководитель Института травматологии и ортопедии;
Н.Ю. Широкова, к.б.н., старший научный сотрудник патологоанатомического отделения;
Д.В. Давыденко, к.б.н., научный сотрудник патологоанатомического отделения;
Н.Ю. Орлинская, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник,
 зав. патологоанатомическим отделением

Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1,
 Н. Новгород, 603005

Проведена оценка эффективности применения различных пластических материалов, наиболее часто используемых для стабилизующих вмешательств на позвоночнике с применением спондилодеза; аутоотрансплантатов; алло- и ксенотрансплантатов; материалов синтетического и биологического происхождения; факторов роста; мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток; трансплантатов, изготовленных с помощью трехмерного моделирования. Выявленные при анализе литературных данных недостатки и преимущества пластических материалов позволяют наметить дальнейшие перспективные пути исследований, учитывать не только свойства биосовместимости и биоинтеграции, но и скорость репаративной регенерации с трансформацией непосредственно в костную ткань.

Ключевые слова: материалы для костной пластики; спондилодез; регенерация костной ткани; замещение костных дефектов.

Как цитировать: Bokov A.E., Mlyavykh S.G., Shirokova N.Y., Davydenko D.V., Orlynskaia N.Y. Current trends in the development of materials for bone grafting and spinal fusion (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(4): 203–219, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.4.24>

English

Current Trends in the Development of Materials for Bone Grafting and Spinal Fusion (Review)

A.E. Bokov, MD, PhD, Head of the Department of Neurosurgery,
 Institute of Traumatology and Orthopedics;
S.G. Mlyavykh, MD, PhD, Head of the Institute of Traumatology and Orthopedics;
N.Y. Shirokova, PhD, Senior Researcher, Department of Pathology and Anatomy;
D.V. Davydenko, PhD, Researcher, Department of Pathology and Anatomy;
N.Y. Orlynskaia, MD, DSc, Professor, Chief Researcher, Head of the Department Pathology and Anatomy
 Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod,
 603005, Russia

The review addresses the currently used materials for spinal stabilization surgery by spinal fusion. Among them: autografts; allo- and xenografts; materials of synthetic and biological origin; growth factors; multipotent mesenchymal stromal cells; grafts made by 3D modeling. We discuss advantages and disadvantages of these materials as reported in the literature; with this analysis, we hope to stimulate further research into the graft biocompatibility and biointegration, especially into the issue of reparative regeneration and graft transformation into the bone tissue.

Key words: materials for bone grafting; spinal fusion; bone regeneration; replacement of bone defects.

Для контактов: Боков Андрей Евгеньевич, e-mail: Andrei_Bokov@mail.ru@mail.ru

Введение

В последние годы наблюдается рост числа патологий опорно-двигательного аппарата. У пациентов пожилого возраста наиболее часто встречаются дегенеративные заболевания позвоночника, лечение которых возможно только путем операции с применением спондилодеза. Несмотря на развитие медицинских технологий, количество неудачных результатов в этой группе больных остается высоким в связи с псевдоартрозом и дестабилизацией фиксатора [1]. Следующими по частоте возникновения заболеваниями, требующими использования костной пластики, являются травмы скелета, онкологические и инфекционные поражения опорно-двигательного аппарата [1–3]. Образовавшиеся вследствие патологического процесса или травматического повреждения дефекты костной ткани нуждаются в замещении различными материалами для восстановления опороспособности поврежденного сегмента [1]. На сегодняшний день при оперативных вмешательствах с применением костной пластики используют как аутологичные, аллогенные и ксеногенные трансплантаты, так и альтернативные искусственные заместители.

Костная аутопластика остается «золотым стандартом» лечения, поскольку только аутооттрансплантаты обладают всеми необходимыми свойствами для наиболее эффективной остеоинтеграции [4, 5]. При этом применение аутооттрансплантатов ограничено из-за невозможности получить большое количество материала и осложнений при заборе костной ткани [5]. Так, у пациентов с остеопорозом качество аутооттрансплантатов, как правило, невысокое, а также сообщается о негативных последствиях взятия у них аутооттрансплантатов [6].

Альтернатива костной аутопластике — применение аллогенных и ксеногенных трансплантатов. Одним из наиболее очевидных их недостатков является то, что они могут быть причиной развития клеточно-опосредованной иммунной реакции отторжения или носителями патогенных инфекционных агентов [5, 7]. Кроме того, эти трансплантаты не обладают свойствами остеогенеза и остеоиндуктивности [5].

Существующие ограничения в применении аллогенных и ксеногенных трансплантатов поддерживают интерес к материалам синтетического и биологического происхождения. Разработаны материалы со сложной внутренней архитектурой (имитирующей трабекулярную структуру губчатой кости), способствующей миграции, адгезии, пролиферации и дифференцировке предшественников остеобластов. При этом они все еще не обладают свойствами, которые могут обеспечить оптимальную остеоинтеграцию трансплантатов.

Недостатки костно-замещающих материалов послужили причиной развития более амбициозных стратегий, включающих в себя инженерию костной ткани в сочетании с применением клеточных технологий и факторов роста [8–10].

Для оценки качества и эффективности функционирования пластических материалов клиницисты используют в основном рентгенологический метод, а также КТ, МРТ. Это связано прежде всего с тем, что в клинических исследованиях неприемлемо осуществлять забор имплантата вместе с окружающей костной тканью для гистологического изучения. В таких случаях визуализировать регенерацию кости вокруг имплантата позволяют указанные методы верификации, которые, однако, лишены возможности идентифицировать тонкие соединительнотканые капсулы, разграничивающие костную ткань и поверхность имплантатов (это приводит к подвижности имплантата), а также оценивать характер остеогенеза с направлением дифференцировки клетки: через остеобластический ряд — непосредственно с формированием молодой костной ткани — или путем энхондрального остеогенеза — через хрящобразование. Эти процессы остеогенеза характеризуются разными сроками регенерации и, несомненно, влияют на скорость восстановления структуры и функции органа, что имеет большое практическое значение [11]. Единственным достоверным методом верификации факта остеоинтеграции в данном случае является морфологическое исследование с морфометрическим анализом детекции границы кость–имплантат, определяющей прямой контакт костной ткани и поверхности имплантата без разграничивающей соединительнотканной капсулы [12–14].

Известно, что среднее время восстановления костной ткани после образования дефекта составляет 6,6 мес, оно может увеличиваться при наличии таких неблагоприятных факторов, как остеопороз и эндокринная патология, что обуславливает еще более долгий срок реабилитации, который не устраивает ни пациентов, ни докторов. С этой точки зрения представляется актуальным поиск пластических материалов, обладающих не только свойствами биосовместимости и биоинтеграции, но и наибольшей скоростью репаративной регенерации с трансформацией непосредственно в костную ткань.

Аутооттрансплантаты

Идеальный костно-пластический материал должен обладать следующими свойствами: остеогенностью, остеоиндуктивностью, остеоиндуктивностью и способностью к остеоинтеграции без формирования отграничивающей капсулы вокруг имплантата [5, 15].

Остеогенность — это способность образовывать костную ткань за счет имеющихся в трансплантате остеобластов или дифференцировки клеток-предшественников в остеобласты.

Остеоиндуктивность — возможность индуцировать формирование остеобластов за счет дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток и их миграцию из тканей реципиента. Такими свойствами обладают факторы роста BMP-2, BMP-7, TGF- β , IGF, FGF, PDGF [16].

Остеокондуктивность — способность трансплантата стать резорбируемой матрицей, которая благоприятствует врастанию костной ткани и сосудов с границы трансплантат–донорское место. Указанные свойства трансплантата в итоге реализуются в остеоинтеграцию — способность сращения с окружающей костной тканью без формирования пограничной капсулы из соединительной ткани, обеспечивая тем самым полное включение трансплантата в структуру кости реципиента [5].

Очевидно, что всеми названными свойствами обладают только аутоотрансплантаты: они содержат остеообласты, клетки-предшественники, осуществляющие остеогенез [9, 17]. Живые клетки, сохраняющиеся в аутоотрансплантате, синтезируют факторы роста, стимулирующие миграцию клеток-предшественников остеогенеза, рост сосудов и формирование новообразованной кости, что свидетельствует об остеоиндуктивности. Аутоотрансплантаты имеют структуру, оптимальную для прорастания клеток, сосудов с последующей перестройкой и остеоинтеграцией. Немаловажно, что аутокость обладает идеальной биологической совместимостью, поскольку не вызывает опосредованного иммунной системой отторжения [18]. Наиболее часто для взятия трансплантатов используют крыло подвздошной кости, лучевую кость, ребро и малоберцовую кость [19–21].

Тем не менее аутологичная костная пластика не лишена недостатков, которые значительно ограничивают ее применение. Известно, что забор аутоотрансплантата является достаточно травматичным оперативным вмешательством, удлиняющим время операции и сопряженным с риском дополнительных осложнений. Так, в литературе описан длительный сохраняющийся болевой синдром в области донорского места, сообщается о формировании гематом, переломе костей таза и лучевой кости, повреждении илиоингвинального нерва, кожного нерва бедра и лучевого нерва, гнойно-воспалительных осложнениях [22–24]. При операциях на позвоночнике также вероятны потеря механической плотности аутоотрансплантата, его частичная резорбция и миграция из сформированного ложа, что, как правило, требует ревизионных оперативных вмешательств [25]. Одним из основных недостатков аутологичной костной пластики является невозможность получить большое количество материала, достаточного для замещения больших костных дефектов [17].

Аллоотрансплантаты и ксенотрансплантаты

Учитывая недостатки аутологичной костной пластики, достаточно широкое распространение получили альтернативные методы лечения с применением аллотрансплантатов и ксенотрансплантатов.

Аллоотрансплантаты — это разновидность костнопластического материала, который получен и используется в пределах одного вида, в то время как

ксенотрансплантаты представляют собой материал, донором которого является организм другого вида [26]. Очевидно, что их продажа как готовых медицинских изделий может позволить преодолеть такой негативный фактор, как недостаточное количество костнопластического материала при аутопластике [27].

Недостатком замещения костных дефектов с применением алло- и ксенотрансплантатов является то, что эти материалы не содержат живых клеток, обладающих способностью к остеогенезу, и имеют меньшую остеоиндуктивность [28]. Обсуждаются потенциальные риски их применения для замещения костной ткани. Если при использовании аллотрансплантатов возможна передача трансмиссивных инфекций, то при применении ксенотрансплантатов — инфицирование зоонозными заболеваниями, такими, как прион-инфекция [26, 29–32]. Аллокость и ксенотрансплантаты имеют в своей структуре чужеродные антигены, которые могут быть причиной биологической несовместимости и в итоге привести к отторжению трансплантата [28, 32].

Известно, что остеоинтеграция происходит в 5 стадий: воспаление, реваскуляризация, остеоиндукция (дифференцировка полипотентных клеток в остеообласты) и остеокондукция, которая завершается ремоделированием костной ткани [9, 32]. Во время второй и третьей стадий возможна сенсбилизация к антигенам при алло- и ксенотрансплантации; здесь существенное значение имеет, какой тип иммунного ответа разовьется в ответ на применяемый костнопластический материал: опосредованный преимущественно Th1- или Th2-лимфоцитами [7, 33]. Синтез Th1-лимфоцитами TNF- β , IFN- γ , IL-2 приводит к активации макрофагов. С другой стороны, Th2-лимфоциты продуцируют IL-4, IL-6, IL-10, которые не активируют фагоцитоз и способствуют остеоинтеграции.

В зависимости от экспрессии рецепторов макрофаги классифицируются на M1 и M2. M1-макрофаги экспрессируют CD68 и CD80 и продуцируют большое количество провоспалительных цитокинов — IL-12, TNF, в итоге стимулируя воспаление, отграничение трансплантата капсулой из соединительной ткани. M2-макрофаги экспрессируют CD163, стимулируют Th2-лимфоциты, продуцируют IL-10, TGF, ингибируя воспалительную реакцию и стимулируя ремоделирование костной ткани [7, 33]. Наличие цитоплазматических белков и антигенов клеточного ядра активирует иммунный ответ, опосредованный M1-макрофагами и Th1-лимфоцитами. Такой иммунный ответ приводит к отторжению костнозамещающего материала [34, 35].

Для того чтобы избежать отторжения трансплантата, применяют различные методы обработки аллоили ксеноматериала с целью уменьшения нагрузки чужеродными антигенами: замораживание или замораживание с высушиванием [32, 36–38]. Существуют и другие более эффективные способы элиминации ядерными и цитоплазматическими антигенами. Для удаления клеточного материала используют Тритон X-100, ЭДТА, трипсин, додецилсульфат натрия [39–

41]. Однако эти агенты способны негативно влиять на механические свойства трансплантатов, что может ухудшить результаты таких операций, как спондилодез, поскольку здесь важна опорная функция применяемых трансплантатов [37, 39, 41, 42].

В попытках избавиться от осложнений при применении аллотрансплантатов пришли к использованию деминерализованного костного матрикса (ДКМ), который содержит протеины, стимулирующие остеогенез [43, 44]. Получают костный матрикс путем деминерализации костной ткани, в которой к концу процесса остается незначительное количество кальцифицированной субстанции, но этот материал богат коллагеном 1-го типа и в нем сохраняются факторы роста [45]. Данные об эффективности применения ДКМ в хирургии позвоночника до сих пор различаются вследствие неоднородности, ограничений дизайна исследований и сильно варьирующих характеристик ДКМ, особенно в отношении активности факторов роста [45, 46]. Преимуществами ДКМ являются стерильность и сниженная антигенность [47–49]. Однако у ДКМ присутствует ряд существенных недостатков: он может выступать в качестве аллергена и имеет низкую механическую прочность. Последний фактор не позволяет использовать данный пластический материал в виде опорного имплантата, поэтому ДКМ применяется как остеобразующая добавка [44, 50, 51].

При замещении больших дефектов костной ткани с использованием различных тканеинженерных конструкций одной из основных проблем является обеспечение надлежащей трофики для адекватной остеоинтеграции. Это критический этап всей технологии, особенно если в область костного дефекта вносятся жизнеспособные клетки, и без должного кровоснабжения можно ожидать их гибели. Клетки, отдаленные от гемомикроциркуляторного русла более чем на 200–500 мкм, гибнут в ходе эксперимента, а костный матрикс замещается волокнистой соединительной тканью [52]. Для обеспечения трофики в области костной пластики изучается модель артериовенозной петли, состоящей из артериального и венозного сосудов, искусственно анастомозированных аутовеной. Артериовенозная петля, помещенная в центральную часть трансплантата, является источником осевой васкуляризации, в результате чего изнутри образуется новая капиллярная сеть — внутренняя васкуляризация, что в сочетании с периферическим ангиогенезом (внешняя васкуляризация) обеспечивает адекватное кровоснабжение, в итоге способствуя выживаемости клеток, входящих в состав имплантатов [53].

Материалы биологического и синтетического происхождения

Недостатки костной пластики с применением аутологичного материала, аллотрансплантатов и ксено-трансплантатов являются причиной неослабевающего интереса к разработке синтетических материалов, ко-

торые могли бы стать скаффолдами для замещения костной ткани. Стремление достигнуть таких свойств, как остеоиндукция и остеогенез, служит мощным стимулирующим фактором для поиска решений с применением клеточной и тканевой инженерии [5]. В действительности обработка ксено- и аллотрансплантатов уже может считаться тканевой инженерией, но в настоящее время разработаны и применяются новые методы замещения костной ткани. Современные материалы, которые используют с этой целью, можно классифицировать как имеющие биологическое происхождение (например, коллаген) и синтетические. Биологические материалы, изготовленные из аллоили ксенокости, обладают остеокондуктивностью, резорбируемостью остеокластами в сроки от 4 до 12 мес и замещаются органотипической костной тканью (при аллогенных материалах) или грубоволокнистой соединительной тканью (при ксеногенных материалах) [54]. Для синтетических материалов основной целевой характеристикой является остеокондуктивность со стабильностью химического состава, геометрической формы, структуры и скорости биологической деградации [4].

Биологические материалы. Из материалов, имеющих биологическое происхождение, для регенерации костной ткани чаще всего используют коллаген, хитозан и альгинат. Доказана эффективность применения коллагеновых трансплантатов с упорядоченным расположением волокон, их способность к пролиферации и дифференцировке клеток в остеобласты [55]. В настоящее время материалы на основе коллагена используются в основном в качестве носителей биологически активных молекул с остеоиндуктивными свойствами [16, 56]. Тем не менее трансплантаты, состоящие только из коллагена, не обладают достаточной прочностью, чтобы служить приемлемым материалом для осуществления костнопластического материала на основе коллагена изучается возможность изготовления композитного материала с добавлением эластина. В исследованиях *in vitro* доказано, что эластин улучшает не только механические свойства трансплантата, но и остеогенную дифференцировку клеток [57]. Также ведется разработка композитных материалов на основе коллагена, кальция фосфата и минерализованного коллагена, которые по биологическим и физическим свойствам значительно ближе к костной ткани [58, 59]. Для доставки клеток и биологически активных остеоиндуктивных молекул рассматривают возможность использования материалов на основе целлюлозы и коллагена, коллагена и альгината [60, 61].

Перспективным для костной пластики считают хитозан. Он разрешен к применению как гемостатический материал. При деполимеризации хитозана выделяются олигосахариды, обладающие антибактериальным эффектом [62]. Материал устойчив и сохраняет молекулярную структуру в нейтральной среде, но деградирует в кислой среде. Хитозан индуцирует

спондилодезе, однако оно обладает антибактериальным эффектом, механизм действия которого сильно отличается от антибактериальных препаратов [81–83]. В связи с этим вероятно, что биоактивное стекло будет востребовано для замещения костных дефектов у пациентов с остеомиелитом, особенно в условиях растущей резистентности бактерий к антибактериальным препаратам [81].

Перспективной считается разработка материалов на основе лактаида, полигликолевой кислоты и полилактид-ко-гликолида [44, 84]. Полигликолевая кислота и полилактид — полимеры с кристаллической структурой. При кополимеризации этих мономеров снижается степень кристаллизации, что облегчает гидратацию и деградацию полимера. Варьируя соотношение мономеров, расположение стереоизомеров и изменяя молекулярную массу полимера, можно получить материалы с повторяющимися контролируемые параметрами в отношении способности к биодеградации, которая будет происходить за период от нескольких недель до нескольких месяцев [4, 85, 86]. Лактаид является более гидрофобным, чем полигликолевая кислота, и увеличение его содержания в полимере приводит к замедлению деградации. В течение последних 30 лет разрабатываются трехмерные пористые скаффолды на основе этого полимера.

Несмотря на относительно хорошую биологическую совместимость, материалы на основе полилактид-ко-гликолида обладают слабой остеокондуктивностью вследствие гидрофобности, препятствующей адгезии клеток и пролиферации [78]. Полилактид-ко-гликолид усиливает воспалительный ответ за счет выделения кислых продуктов деградации, которые способны препятствовать колонизации клетками [78, 4]. Тем не менее продукты деградации этого полимера являются естественными метаболитами и не обладают цитотоксическим эффектом [4]. Кроме того, трансплантаты из полилактид-ко-гликолида имеют субоптимальные механические свойства, что затрудняет применение этих материалов, если важна опороспособность трансплантатов. Для того чтобы устранить недостатки остеокондуктивности этого материала, его часто используют в сочетании с другими биополимерами — коллагеном, желатином, хитозаном, а для улучшения механических свойств добавляют поликапролактон [84, 87]. С этой целью применяют также керамику и биоактивное стекло, разрабатывают биологически активные покрытия [84].

Большинство из изученных синтетических материалов не обладают всеми свойствами, оптимальными для эффективного замещения костной ткани [4, 5, 78, 79, 84, 88]. Их улучшение возможно за счет разработки композитных материалов. Известно, что материалы на основе кальция фосфата и коллагена, кальция фосфата и полилактид-ко-гликолида обладают лучшими механическими свойствами и более выраженной остеокондуктивностью. Тем не менее в настоящее время доказано, что так же значимы пористость, размеры

пор и их соединенность, скорость деградации материала, его гидрофильность [84, 89]. Гидрофобность материалов затрудняет формирование колоний клеток в трансплантате, препятствует прорастанию трансплантата сосудами и новообразованной костной тканью. При оперативных вмешательствах на позвоночнике важна опороспособность трансплантатов. Резистентность кортикальной кости человека варьирует в пределах 90–230 МПа, в то время как резистентность губчатой кости к компрессионным нагрузкам — от 2 до 90 МПа [89]. При недостаточной механической прочности не происходит эффективного распределения нагрузки между металлоконструкцией, фиксирующей поврежденный сегмент, и трансплантатом. Это может привести или к поломке, или к расшатыванию фиксатора. Избыточная твердость фиксатора способна замедлять сращение и вызывать резорбцию костной ткани вокруг трансплантата [90]. Наличие пор обеспечивает необходимую остеокондуктивность и биорезорбируемость искусственных материалов, применяющихся для костной пластики. В эксперименте с кальцийфосфатными материалами доказано, что макропоры размером 100–300 мкм больше всего способствуют прорастанию трансплантата костной тканью [5, 89–92]. Если поры имеют меньший размер (менее 75 мкм), то они часто прорастают неминерализованной костной тканью или даже фиброзной костной тканью [89]. Интересно, но таких закономерностей не выявлено в эксперименте на пористых титановых имплантатах [93], из чего следует, что размер пор для каждого материала должен быть определен отдельно и универсальных параметров нет. Наилучшими свойствами обладают материалы с соединяющимися порами, такие поры — ключевое условие для прорастания костной ткани [94]. С другой стороны, материалы с несоединяющимися порами на более длительное время удерживают остеогенные клетки, что может приводить к более быстрому заполнению пор новообразованной костной тканью [89]. Поры способствуют прорастанию костной ткани в трансплантат, но пористая структура материала ослабляет его механическую прочность. Для разработки эффективного материала необходим рациональный баланс между пористостью и механической прочностью [89].

При разработке трансплантата для костной пластики на основе синтетических материалов остро встает вопрос получения изделий со стандартными свойствами (пористость, механическая прочность, сроки деградации) [4, 5, 95], особенно если планируется их промышленный выпуск. Достигнуть стандартной пористости, стандартного состава, структуры и механической прочности можно только с помощью 3D-печати. Другие ранее применявшиеся способы, такие как формирование губки, вспенивание материала, существенно уступают ей по эффективности [95]. В настоящее время растет производство костно-замещающих материалов, полученных методом стреофотографии, наплавления, селективного лазерного спекания и

3D-печати, которые позволяют получать в том числе имплантаты с индивидуальными свойствами [96–99]. Созданы и применяются композитные материалы на основе полимеров, биоактивного стекла, трикальцийфосфатов и коллагена [4]. При всех достоинствах композитных материалов, полученных с помощью аддитивных технологий, нерешенной остается проблема васкуляризации трансплантата, в связи с чем предлагается использовать их или с факторами роста, или с применением клеточных технологий.

Клеточные технологии

В настоящее время очевидно, что улучшить остеоиндуктивность и остеогенные свойства костно-замещающих материалов можно только применением клеточных технологий. Ключевая роль в регенерации костной ткани отводится стволовым клеткам — это гетерогенная популяция клеток, которые находятся в крови, жировой ткани, крови пуповины и костном мозге [100]. Стволовые клетки мигрируют в область активного воспалительного процесса в ответ на выделяющиеся хемокины и участвуют в процессе регенерации [101, 102]. При их применении происходит модуляция иммунного ответа — снижение секреции IL-1- β , IL-6, TNF- α , причем стволовые клетки не влияют на синтез IL-10 и IL-13 [103]. Такие клетки способны ингибировать иммунный ответ, являясь супрессорами для дендритных клеток, а также функцию натуральных киллеров, что в итоге может уменьшить иммунную реакцию на трансплантат [104, 105]. Доказано, что в условиях гипоксии и при воздействии различных провоспалительных факторов в области повреждения активируется синтез стволовыми клетками таких биологически активных молекул, как эпителиальный фактор роста EGF, фактор роста фибробластов FGF и инсулиноподобный фактор роста IGF, которые замедляют апоптоз клеток и стимулируют неоангиогенез [106]. Доказано, что при применении стволовых клеток в месте сращения перелома, смоделированного у лабораторных животных, происходит увеличение костной мозоли за счет усиления остеогенеза и хондрогенеза [103]. Эти клетки стимулируют интрамембранозный остеогенез, а если применяется хондрогенная дифференцировка воздействием TGF- β , то наблюдается энхондральное окостенение в новообразованной костной ткани [102]. Аллогенные стволовые клетки способствуют образованию спондиледеза, не вызывая побочных эффектов [107, 108]. Трансплантаты из гидроксиапатита, трикальцийфосфата в сочетании со стволовыми клетками успешно используют при реконструкции краниофациальных и критических дефектов длинной трубчатой кости у животных [108–120]. Клеточные технологии еще не одобрены для клинического применения в большинстве стран, поэтому встречается мало сообщений об успешном замещении у пациентов костного дефекта трансплантатом со стволовыми клетками [108, 121, 122].

Несмотря на обнадеживающие результаты, остается открытым вопрос в отношении эффективности и безопасности методик с применением стволовых клеток, о возможных иммунных реакциях при использовании аллогенных стволовых клеток [102]. Есть данные о том, что пролиферация стволовых клеток может стать неконтролируемой, а мезенхимальные стволовые клетки — опухоленными [123]. Встречаются сообщения о формировании саркомы в области воспринимающего ложа предположительно за счет супрессии противоопухолевого иммунитета [124]. В связи с этим в настоящее время считаются перспективными работы, направленные на изучение дифференцировки стволовых клеток в остеогенном или хондрогенном направлении [96].

Факторы роста

Для улучшения остеоиндуктивных свойств костно-замещающих материалов исследуют возможность применения факторов роста, однако полученные результаты неоднородны. Наиболее изученные факторы роста — bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), BMP-7, fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor beta 3 (TGF- β 3), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF) [16].

Костные морфогенетические белки представляют собой многофункциональные ростовые факторы, оказывающие значительное воздействие на рост, дифференцировку и апоптоз различных типов клеток, включая остеобласты, эпителиальные и нервные клетки, хондробласты [125, 126]. Также эти белки ускоряют дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в остеобласты и хондробласты, увеличивают синтез остеокальцина, ускоряют синтез коллагена, повышают активность щелочной фосфатазы, стимулируют синтез внеклеточного матрикса и его последующую минерализацию [127]. В настоящее время открыто 20 разновидностей BMP, но только у BMP-2, -4, -6, -7 выявлены значительные остеоиндуктивные свойства [128, 129]. Под влиянием BMP-2 и BMP-7 происходит усиление остеогенеза в 1,2–21,0 и 1,1–95,0 раза соответственно, однако оптимальная концентрация этих факторов роста неизвестна: разброс применяемых в экспериментах доз варьировался от 5 до 100 мкг для BMP-2 и от 100 мкг до 3,5 мг для BMP-7 [16]. Выявлено, что совместное действие BMP-2 и BMP-7 синергично, в этом случае остеогенез усиливается в 1,5 раза по сравнению с моделями, в которых каждый фактор применялся по отдельности. При одновременном применении VEGF и BMP-2 улучшается регенерация костной ткани, так как первый фактор стимулирует неоангиогенез, а второй — остеогенную дифференцировку клеток [16]. В качестве носителей для BMP на сегодняшний день используют различные материалы, такие как деминерализованный костный мат-

рикс, коллагеновые губки, хитозан, желатин, гидроксиапатит. Носители обеспечивают не только доставку BMP в место их биологического действия, но и сохранение остеоиндукторов в зоне воздействия в течение длительного периода времени, необходимого для формирования новой кости [62, 129, 130]. При планировании лечения пациента с использованием BMP следует учитывать возраст реципиента, поскольку он напрямую влияет на биологический потенциал многих факторов роста. Остеоиндуктивная способность BMP снижается как минимум в 2 раза у пожилых пациентов, следовательно, требуются более высокие дозы, чтобы вызвать ощутимый стимулирующий эффект на образование костной ткани [131, 132].

В клинических исследованиях по применению рекомбинантного человеческого BMP-2 при спондилодезе на уровне поясничного и шейного отделов сообщается об эффективности этого фактора, превышающей даже использование аутотрансплантатов [133–136]. Тем не менее частота осложнений составляет 11%, а выявляемость злокачественных опухолей — 3,4%, также отмечены иммунные реакции на BMP-2, случаи почечной недостаточности и наджелудочковой аритмии [137–139]. BMP-2 рекомендован к применению в спинальной хирургии для ускорения формирования костного блока. Клинических данных в отношении BMP-7 недостаточно для каких-либо выводов [140].

Определенный интерес как потенциальный фактор, стимулирующий регенерацию костной ткани, вызывает FGF-2. Его доза в экспериментах варьировала от 0,01 до 200 мкг. Было выявлено, что под воздействием этого фактора роста происходит усиление остеогенеза в 1,1–16,4 раза [16]. Эффект дозозависим, предполагаемый механизм действия FGF-2 — неоангиогенез и оссификация, однако некоторые авторы считают, что этот фактор роста фибробластов в большей степени влияет на хондрогенез, чем на остеогенез [16, 140, 141]. Воздействие FGF-2 на остеогенез сильнее, чем FGF-1, но при постоянном поступлении фактора в область остеогенеза его эффективность снижается. Совместное применение BMP-2 и FGF-2 снижает эффективность первого: фактор роста фибробластов тормозит остеогенез [16].

Предполагается, что PDGF может регенерировать костную ткань как митоген. Он способен быть хемотактантом для стволовых клеток и стимулировать секрецию факторов роста макрофагами [142–144]. PDGF усиливает регенерацию в области костного дефекта в эксперименте в 1,4–2,4 раза, применяемые при этом дозы — 0,01–80,0 мкг [16]. При высоких дозах отмечено, что в некоторых случаях снижается костная плотность в области остеогенеза, также отмечено, что в некоторых случаях не происходит сращения перелома при совместном применении PDGF и VEGF [16]. При сочетании PDGF и BMP-2 последний усиливает остеогенез, предположительно этот фактор необходим для энхондрального окостенения [16]. Тем не менее опубликованы данные, не под-

тверждающие значимого влияния PDGF на регенерацию костной ткани [145].

TGF- β — один из важнейших факторов остеогенеза, но его роль неоднозначна. Как правило, действие фактора способствует формированию хряща с последующим окостенением. Изолированное применение TGF- β 3 приводит к повышению интенсивности остеогенеза в 1,75–3,0 раза. Иногда происходит формирование хряща без увеличения костной массы. Существенно повышает эффективность TGF- β его совместное применение с BMP-2 или стволовыми клетками, тогда интенсивность остеогенеза увеличивается в 5 раз [16]. Известно, что TGF- β 1 улучшает синтез м-РНК-маркеров остеобластов и щелочной фосфатазы стволовых клеток мышей, но тормозит экспрессию остеокальцина [146, 147]. Его эффекты зависят как от плотности клеток, так и от стадии дифференцировки; эффект является дозозависимым и имеет двухфазное действие [148–151]. Однократное воздействие TGF- β 1 в дозе 1 нг/мл приводит к дифференцировке остеобластов, повторное — тормозит дифференцировку [152, 153]. Основным механизмом ингибирования при повторном воздействии — снижение синтеза IGF-1 [153]. Если добавить 200 нг/мл экзогенного IGF-1, то это восстановит синтез щелочной фосфатазы остеобластами, таким образом устранится вызванная TGF- β 1 супрессия [153].

Значимый фактор для дифференцировки остеобластов, а также для роста кости — IGF-1. Он вырабатывается остеоцитами и зрелыми остеобластами, депонируется в кости, высвобождается по мере резорбции. Цитокин не вызывает остеогенную дифференцировку стволовых клеток, но усиливает функцию зрелых остеобластов [153, 154]. IGF-1 связан с модулированием механотрансдукции в костной ткани [154]; повышение синтеза фактора роста является ранним ответом костной ткани на механическую нагрузку. При гиперсекреции IGF-1 у трансгенных мышей происходит повышенный остеогенез в ответ на механическую нагрузку [155–157]. При отсутствии нагрузки на кость введение IGF-1 не приводит к повышенному остеогенезу [158, 159]. Повреждение в гене *IGF-1* остеобластов значительно снижает остеогенез в ответ на механическую нагрузку [159]. Роль цитокина для костной пластики исследована в экспериментах на животных; IGF-1 совместно с PDGF положительно влиял на интеграцию имплантатов [160].

Опубликовано немало работ, посвященных возможности применения цитокинов группы VEGF для улучшения костной регенерации. Ведущими звеньями патогенеза при повреждении костной ткани являются некроз и гипоксия. VEGF необходим для формирования нормальной сосудистой сети в местах повреждения ткани [161]. При введении имплантатов с VEGF в область костного дефекта усиливается васкуляризация и происходит увеличение костной массы в 1,6–2,0 раза [161]. С другой стороны, есть сообщения о том, что происходит лишь уси-

ние ангиогенеза без увеличения костной массы [16]. Вероятная причина таких противоположных результатов — кинетика высвобождения VEGF из носителя. Необходимо медленное и длительное высвобождение VEGF, иначе возможно формирование капилляров без связи с сосудистым руслом или образование ангиом при гиперстимуляции [162].

Гомолог VEGF — плацентарный фактор роста (PlGF) — также рассматривают как фактор с потенциальным влиянием на регенерацию костной ткани. Есть данные, подтверждающие его важность в четырех ключевых процессах восстановления кости. Прежде всего PlGF необходим для эффективной инициации воспалительного процесса и ангиогенеза в ответ на повреждение. Во-вторых, он влияет на пролиферацию и дифференциацию мезенхимальных клеток-предшественников. В-третьих, стимулирует образование хряща опосредованно с помощью цепочек матричных металлопротеиназ. В-четвертых, PlGF обязателен для оптимального ремоделирования вновь образованной кости [163]. PlGF рассматривают и как аутокринный регулирующий фактор стволовых клеток. При его секреции в низких концентрациях (20 нг/мл) повышается остеогенная дифференцировка, а при более высоких — 50 нг/мл — индуцируется остеокластогенез и ангиогенез. Таким образом обеспечиваются предпосылки для процессов костного ремоделирования и репарации [164]. В исследованиях *in vitro* также доказан факт хемотаксиса мезенхимальных клеток-предшественников в ответ на PlGF [163, 164]. Выявлено, что PlGF значительно усиливает остеоиндуктивный эффект BMP-2 [165].

Перспективы разработки костно-замещающих материалов

В связи с большой частотой травматических повреждений, распространенностью дегенеративной и воспалительной патологии опорно-двигательного аппарата интерес к костной пластике и замещению дефектов костной ткани продолжает расти. Известно, что перечисленные группы заболеваний являются частыми причинами временной и стойкой нетрудоспособности, следовательно, трудно переоценить негативные социально-экономические последствия этих патологий [1, 2, 3, 55]. При замещении костного дефекта аутопластикой остается «золотым стандартом» лечения, поскольку только такие трансплантаты обладают оптимальными остеогенностью, остеоиндуктивностью и остеокондуктивностью, обеспечивая наиболее эффективную остеоинтеграцию [5]. При всех достоинствах костная аутопластика имеет и свои ограничения, прежде всего связанные с травматичностью взятия ауто трансплантатов и невозможностью обеспечить достаточное количество материала для замещения больших костных дефектов [51, 166]. Аллотрансплантаты и ксенотрансплантаты очень сильно уступают аутокости по способности к остеоин-

теграции, так как они фактически представляют собой только матрицу, соответствующую по структуре костной ткани, которая не содержит ни факторов роста, ни живых клеток [5, 88]. Кроме того, существуют риски применения аллогенной и аутогенной кости в связи с возможной трансмиссией инфекций, ксеногенных и аллогенных материалов — в связи с биологической несовместимостью [51, 88].

Указанные факторы мотивируют поиск новых решений. В настоящее время предложено большое количество синтетических и имеющих биологическое происхождение материалов [5]. Доказано, что идеальный материал должен обладать достаточной механической прочностью, гидрофильностью, биологической совместимостью, кроме того, желательны остеоиндуктивные и остеогенные свойства. Фактически ни один из материалов не обладает оптимальным сочетанием таких свойств. В связи с этим перспективным направлением стала разработка композитных трансплантатов, которые сочетали бы достоинства нескольких материалов [5, 167]. Следующей проблемой, с которой сталкиваются производители костно-замещающих материалов, является разработка имплантатов с воспроизводимыми стандартными свойствами, такими, как скорость биологической деградации и механическая прочность [167]. Кроме того, необходимо определить и стандартные размеры пор у имплантатов, которые способствовали бы прорастанию сосудов и новообразованной костной ткани [89]. Такие материалы могут быть созданы при помощи аддитивных технологий, и в литературе неоднократно сообщается об успешном доклиническом испытании подобных трансплантатов [4, 5].

Оптимальные физические свойства, биодegradируемость и структура, приближающаяся к костной ткани, еще недостаточны для эффективной остеоинтеграции. Для того чтобы придать остеогенные свойства трансплантатам, разрабатываются клеточные технологии с применением стволовых клеток. Получены результаты, которые свидетельствуют о перспективности этого направления [1, 5, 106, 168]. Доказано, что даже аспират аутологичного костного мозга придает остеогенные свойства трансплантатам, ускоряя формирование костного блока [47]. Получены положительные результаты как в моделях спондиледоза у животных, так и в моделях замещения костных дефектов свода черепа и длинных трубчатых костей. С другой стороны, если планируется использовать аутологичные клетки, то необходима дополнительная операция по забору жировой ткани или костного мозга, что может лимитировать их применение. Установлено, что аллогенные стволовые клетки эффективны для увеличения регенерации костной ткани при костной пластике, однако иммунная реакция на них является предметом изучения [102]. Обсуждаются риски применения клеточных технологий на основе стволовых клеток — их туморогенность [123, 124]. Дополнительным фактором, ограничивающим применение стволовых клеток,

является отсутствие нормативов и правовой базы, которые регламентировали бы их использование.

С целью усиления остеоиндуктивных свойств трансплантатов перспективной представляется возможность применения цитокинов и факторов роста, но это направление мало изучено и данные литературы иногда рознятся вплоть до взаимоисключающих фактов [16]. Проблемой исследований в этой области является неоднородность дизайнов. Дозы цитокинов и факторов роста отличаются, сроки вывода животных из эксперимента также разные [16]. Установлено, что факторы роста и цитокины участвуют в сложных процессах, результативность их воздействия может отличаться в зависимости от принимаемой дозы, микроокружения и стадии остеогенеза. Ярким примером этих особенностей служат данные, накопленные по влиянию на остеогенез TGF- β и PLGF [152, 153, 164]. Наиболее изучены перспективы применения BMP-2 для регенерации костной ткани, но нет однозначного мнения в отношении безопасности его применения. Имеющиеся противоречия в результатах исследований свидетельствуют лишь о том, что это еще начало пути развития тканевых технологий.

Заключение

Следует считать неоспоримым фактом, что только сочетание аддитивных технологий, обеспечивающих производство композитных биodeградируемых материалов, с клеточными и тканевыми технологиями способно приблизить современные трансплантаты к желаемым параметрам в отношении остеоиндуктивности, остеокондуктивности, остеогенности и опороспособности. Несмотря на обилие исследований и предлагаемых подходов, метод создания оптимально пригодных для практического применения тканеинженерных конструкций пока не найден. Тем не менее накопленные в этой области знания свидетельствуют о том, что такие разработки являются наиболее перспективными для достижения результата — получение трансплантата, максимально приближенного по срокам регенерации и характеристикам к нативной кости.

Финансирование исследования. Исследование выполнено в рамках гранта Российского научного фонда «Гибридные органические материалы для синтеза персонифицированных костнозамещающих имплантатов с использованием аддитивных технологий» (проект №18-13-00434).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

Литература/References

1. Werner B.C., Li X., Shen F.H. Stem cells in preclinical spine studies. *Spine J* 2014; 14(3): 542–551, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.08.031>.
2. Amin S., Achenbach S.J., Atkinson E.J., Khosla S.,

Melton L.J. 3rd. Trends in fracture incidence: a population-based study over 20 years. *J Bone Miner Res* 2014; 29(3): 581–589, <https://doi.org/10.1002/jbmr.2072>.

3. van Vugt T.A., Geurts J., Arts J.J. Clinical application of antimicrobial bone graft substitute in osteomyelitis treatment: a systematic review of different bone graft substitutes available in clinical treatment of osteomyelitis. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 6984656, <https://doi.org/10.1155/2016/6984656>.

4. Grémare A., Guduric V., Bareille R., Heroguez V., Latour S., L'heureux N., Fricain J.C., Catros S., Le Nihouannen D. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2018; 106(4): 887–894, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36289>.

5. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014; 9(1): 18, <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>.

6. Ehrler D.M., Vaccaro A.R. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 371: 38–45, <https://doi.org/10.1097/00003086-200002000-00005>.

7. Badylak S.F., Gilbert T.W. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol* 2008; 20(2): 109–116, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.003>.

8. Brydone A.S., Meek D., MacLaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 2010; 224(12): 1329–1343, <https://doi.org/10.1243/09544119jeim770>.

9. Athanasiou V.T., Papachristou D.J., Panagopoulos A., Saridis A., Scopa C.D., Megas P. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. *Med Sci Monit* 2010; 16(1): BR24–31.

10. Parikh S.N. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med* 2002; 48(2): 142–148.

11. Рерих В.В., Аветисян А.Р., Зайдман А.М., Ластевский А.Д., Батаев В.А., Никулина А.А. Остеоинтеграция гидроксипатитовых гранул в телах поясничных позвонков в эксперименте. *Хирургия позвоночника* 2013; 4: 43–51. Rerikh V., Avetisyan A., Zaidman A., Lastevsky A., Bataev V., Nikulina A. Experimental osseointegration of hydroxyapatite granules in the lumbar vertebral bodies. *Hirurgia pozvonocnika* 2013; 4: 43–51, <https://doi.org/10.14531/ss2013.4.43-51>.

12. Becker S., Maissen O., Ponomarev I., Stoll T., Rahn B., Wilke I. Osteopromotion by a beta-tricalcium phosphate/bone marrow hybrid implant for use in spine surgery. *Spine* 2006; 31(1): 11–17, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000192762.40274.57>.

13. Daculsi G., Uzel A.P., Weiss P., Goyenvalle E., Aguado E. Developments in injectable multiphasic biomaterials. The performance of microporous biphasic calcium phosphate granules and hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 21(3): 855–861, <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3914-y>.

14. Uchida A., Araki N., Shinto Y., Yoshikawa H., Kurisaki E., Ono K. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72(2): 298–302, <https://doi.org/10.1302/0301-620x.72b2.2155908>.

15. Albrektsson T., Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001; 10(Suppl 2): S96–S101, <https://doi.org/10.1007/s005860100282>.

16. Gothard D., Smith E.L., Kanczler J.M., Rashidi H., Qutachi O., Henstock J., Rotherham M., El Haj A., Shakesheff K.M., Oreffo R.O. Tissue engineered bone using

select growth factors: a comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 2014; 28: 166–207, <https://doi.org/10.22203/ecm.v028a13>.

17. Pape H.C., Evans A., Kobbe P. Autologous bone graft: properties and techniques. *J Orthop Trauma* 2010; 24(Suppl 1): S36–S40, <https://doi.org/10.1097/bot.0b013e3181cec4a1>.

18. Greenwald A.S., Boden S.D., Goldberg V.M., Khan Y., Laurencin C.T., Rosier R.N.; American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological Implants. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A(Suppl 2 Pt 2): 98–103, <https://doi.org/10.2106/00004623-200100022-00007>.

19. Mauffrey C., Madsen M., Bowles R.J., Seligson D. Bone graft harvest site options in orthopaedic trauma: a prospective in vivo quantification study. *Injury* 2012; 43(3): 323–326, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.08.029>.

20. Iyer R.R., Tuite G.F., Meoded A., Carey C.C., Rodriguez L.F. A modified technique for occipitocervical fusion using compressed iliac crest allograft results in a high rate of fusion in the pediatric population. *World Neurosurg* 2017; 107: 342–350, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.07.172>.

21. Goyal T., Sankineani S.R., Tripathy S.K. Local distal radius bone graft versus iliac crest bone graft for scaphoid nonunion: a comparative study. *Musculoskelet Surg* 2013; 97(2): 109–114, <https://doi.org/10.1007/s12306-012-0219-y>.

22. Ebraheim N.A., Elgafy H., Xu R. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9(3): 210–218, <https://doi.org/10.5435/00124635-200105000-00007>.

23. Kim D.H., Rhim R., Li L., Martha J., Swaim B.H., Banco R.J., Jenis L.G., Tromanhauser S.G. Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity. *Spine J* 2009; 9(11): 886–892, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2009.05.006>.

24. Christensen B.B. Autologous tissue transplantations for osteochondral repair. *Dan Med J* 2016; 63(4): B5236.

25. Dimar J.R. 2nd, Glassman S.D., Burkus J.K., Pryor P.W., Hardacker J.W., Carreon L.Y. Two-year fusion and clinical outcomes in 224 patients treated with a single-level instrumented posterolateral fusion with iliac crest bone graft. *Spine J* 2009; 9(11): 880–885, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2009.03.013>.

26. Zamborsky R., Svec A., Bohac M., Kilian M., Kokavec M. Infection in bone allograft transplants. *Exp Clin Transplant* 2016; 14(5): 484–490.

27. Müller M.A., Frank A., Briel M., Valderrabano V., Vavken P., Entezari V., Mehrkens A. Substitutes of structural and non-structural autologous bone grafts in hindfoot arthrodeses and osteotomies: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord* 2013; 14(1): 59, <https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-59>.

28. Smith C.A., Richardson S.M., Eagle M.J., Rooney P., Board T., Hoyland J.A. The use of a novel bone allograft wash process to generate a biocompatible, mechanically stable and osteoinductive biological scaffold for use in bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; 9(5): 595–604, <https://doi.org/10.1002/term.1934>.

29. Kim Y., Rodriguez A.E., Nowzari H. The risk of prion infection through bovine grafting materials. *Clin Implant Dent Relat Res* 2016; 18(6): 1095–1102, <https://doi.org/10.1111/cid.12391>.

30. Mirabet V., Álvarez M., Luis-Hidalgo M., Galán J., Puig N., Larrea L., Arbona C. Detection of hepatitis B

virus in bone allografts from donors with occult hepatitis B infection. *Cell Tissue Bank* 2017; 18(3): 335–341, <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9644-3>.

31. Ward W.G., Heise E., Boles C., Kiger D., Gautreaux M., Rushing J., Smith B.P., Bullard D. Human leukocyte antigen sensitization after structural cortical allograft implantations. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 435: 31–35, <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000165848.43820.98>.

32. Gomes K.U., Carlini J.L., Biron C., Rapoport A., Dedivitis R.A. Use of allogeneic bone graft in maxillary reconstruction for installation of dental implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66(11): 2335–2338, <https://doi.org/10.1016/j.joms.2008.06.006>.

33. Allman A., McPherson T., Badylak S., Merrill L., Kallakury B., Sheehan C., Raeder R., Metzger D. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response. *Transplantation* 2001; 71(11): 1631–1640, <https://doi.org/10.1097/00007890-200106150-00024>.

34. Brown B.N., Valentin J.E., Stewart-Akers A.M., McCabe G.P., Badylak S.F. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* 2009; 30(8): 1482–1491, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.040>.

35. Valentin J.E., Stewart-Akers A.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(7): 1687–1694, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0419>.

36. Keating J.F., McQueen M.M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83(1): 3–8, <https://doi.org/10.1302/0301-620x.83b1.11952>.

37. Malinin T., Temple H.T. Comparison of frozen and freeze-dried particulate bone allografts. *Cryobiology* 2007; 55(2): 167–170, <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.05.007>.

38. Kurien T., Pearson R.G., Scammell B.E. Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice: the evidence for their use. *Bone Joint J* 2013; 95-B(5): 583–597, <https://doi.org/10.1302/0301-620x.95b5.30286>.

39. Elder B.D., Eleswarapu S.V., Athanasios K.A. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials* 2009; 30(22): 3749–3756, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.050>.

40. Vavken P., Joshi S., Murray M.M. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *J Orthop Res* 2009; 27(12): 1612–1618, <https://doi.org/10.1002/jor.20932>.

41. Gui L., Chan S.A., Breuer C.K., Niklason L.E. Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16(2): 173–184, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0120>.

42. Fölsch C., Mittelmeier W., Bilderbeek U., Timmesfeld N., von Garrel T., Matter P.H. Effect of storage temperature on allograft bone. *Transfus Med Hemother* 2012; 39(1): 36–40, <https://doi.org/10.1159/000335647>.

43. Sandhu H.S., Khan S.N., Suh D.Y., Boden S.D. Demineralized bone matrix, bone morphogenetic proteins, and animal models of spine fusion: an overview. *Eur Spine J* 2001; 10(Suppl 2): S122–S131, <https://doi.org/10.1007/s005860100303>.

44. Fernandez de Grado G., Keller L., Idoux-Gillet Y., Wagner Q., Musset A.M., Benkirane-Jessel N., Bornert F., Offner D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects

- management. *J Tissue Eng* 2018; 9: 2041731418776819, <https://doi.org/10.1177/2041731418776819>.
45. Miyazaki M., Tsumura H., Wang J.C., Alanay A. An update on bone substitutes for spinal fusion. *Eur Spine J* 2009; 18(6): 783–799, <https://doi.org/10.1007/s00586-009-0924-x>.
46. Buser Z., Brodke D.S., Youssef J.A., Rometsch E., Park J.B., Yoon S.T., Wang J.C., Meisel H.J. Allograft versus demineralized bone matrix in instrumented and noninstrumented lumbar fusion: a systematic review. *Global Spine J* 2018; 8(4): 396–412, <https://doi.org/10.1177/2192568217735342>.
47. Cornell C.N., Lane J.M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355(Suppl): S267–S273, <https://doi.org/10.1097/00003086-199810001-00027>.
48. Кирилова И.А. Деминерализованный костный трансплантат как стимулятор остеогенеза: современные концепции. Хирургия позвоночника 2004; 3: 105–110. Kirilova I.A. Demineralized bone graft as an osteogenesis stimulator: current literature review. *Hirurgia pozvonocnika* 2004; 3: 105–110.
49. Ivchenko V.K., Fadeev G., Pikaliuk V.S., Opalinskaia L. The stimulation of reparative regeneration with demineralized bone matrix in puncture osteoplasty operations for bone cysts in children. *Vestnik hirurgii im. I.I. Grekova* 1994; 153(7–12): 83–86.
50. Kinney R.C., Ziran B.H., Hirshorn K., Schlatterer D., Ganey T. Demineralized bone matrix for fracture healing: fact or fiction? *J Orthop Trauma* 2010; 24(Suppl 1): S52–S55, <https://doi.org/10.1097/bot.0b013e3181d07ffa>.
51. Campana V., Milano G., Pagano E., Barba M., Cicione C., Salonna G., Lattanzi W., Logroscino G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med* 2014; 25(10): 2445–2461, <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5240-2>.
52. Folkman J., Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 1973; 138(4): 745–753, <https://doi.org/10.1084/jem.138.4.745>.
53. Lokmic Z., Stillaert F., Morrison W.A., Thompson E.W., Mitchell G.M. An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB J* 2007; 21(2): 511–522, <https://doi.org/10.1096/fj.06-6614com>.
54. Bigham A.S., Dehghani S.N., Shafiei Z., Torabi Nezhad S. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *J Orthop Traumatol* 2008; 9(2): 73–80, <https://doi.org/10.1007/s10195-008-0006-6>.
55. Pastorino L., Dellacasa E., Scaglione S., Giulianelli M., Sbrana F., Vassalli M., Ruggiero C. Oriented collagen nanocoatings for tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 114: 372–378, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.026>.
56. Hamilton P.T., Jansen M.S., Ganesan S., Benson R.E., Hyde-Deruysscher R., Beyer W.F., Gile J.C., Nair S.A., Hodges J.A., Grøn H. Improved bone morphogenetic protein-2 retention in an injectable collagen matrix using bifunctional peptides. *PLoS One* 2013; 8(8): e70715, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070715>.
57. Amruthwar S.S., Janorkar A.V. In vitro evaluation of elastin-like polypeptide-collagen composite scaffold for bone tissue engineering. *Dent Mater* 2013; 29(2): 211–220, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.10.003>.
58. Thula T.T., Rodriguez D.E., Lee M.H., Pendi L., Podschun J., Gower L.B. In vitro mineralization of dense collagen substrates: a biomimetic approach toward the development of bone-graft materials. *Acta Biomater* 2011; 7(8): 3158–3169, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.04.014>.
59. Inzana J.A., Olvera D., Fuller S.M., Kelly J.P., Graeve O.A., Schwarz E.M., Kates S.L., Awad H.A. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials* 2014; 35(13): 4026–4034, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.064>.
60. Perez R.A., Kim M., Kim T.H., Kim J.H., Lee J.H., Park J.H., Knowles J.C., Kim H.W. Utilizing core-shell fibrous collagen-alginate hydrogel cell delivery system for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(1–2): 103–114, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0198>.
61. Aravamudhan A., Ramos D.M., Nip J., Harmon M.D., James R., Deng M., Laurencin C.T., Yu X., Kumbar S.G. Cellulose and collagen derived micro-nano structured scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9(4): 719–731, <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1574>.
62. LogithKumar R., KeshavNarayan A., Dhivya S., Chawla A., Saravanan S., Selvamurugan N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydr Polym* 2016; 151: 172–188, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.049>.
63. Venkatesan J., Anil S., Kim S.K., Shim M.S. Chitosan as a vehicle for growth factor delivery: various preparations and their applications in bone tissue regeneration. *Int J Biol Macromol* 2017; 104(Pt B): 1383–1397, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.072>.
64. Лекишвили М.В., Балберкин А.В., Колондаев А.Ф., Васильев М.Г., Баранецкий А.Л., Буклемишев Ю.В. Первый опыт применения в клинике костной патологии биокомпозиционного материала «Остеоматрикс». Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова 2002; 4: 80–83. Lekishvili M.V., Balberkin A.V., Kolondaev A.F., Vasil'ev M.G., Baranetskiy A.L., Buklemishev Yu.V. The first experience of using the Osteomatrix biocomposite material in the bone pathology clinic. *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova* 2002; 4: 80–83.
65. Дунаев М.В., Китаев В.А., Матавкина М.В., Дружинин А.Е., Бубнов А.С. Сравнительный анализ и клинический опыт использования остеопластических материалов на основе недеминерализованного костного коллагена и искусственного гидроксиапатита при закрытии костных дефектов в амбулаторной хирургической стоматологии. Вестник Российской академии медицинских наук 2014; 69(7–8): 112–120. Dunaev M.V., Kitaev V.A., Matavkina M.V., Druzhinin A.E., Bubnov A.S. Comparative analysis and clinical experience with osteoplastic materials based on non-demineralized bone collagen and artificial hydroxylapatite at the close of bone defects in ambulatory surgical dentistry. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* 2014; 69(7–8): 112–120, <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1117>.
66. Сирак С.В., Козиева И.Э., Мартиросян А.К. Клинико-экспериментальное использование остеопластических материалов в сочетании с электромагнитным излучением для ускорения регенерации костных дефектов челюстей. Фундаментальные исследования 2013; 5–2: 389–393. Sirak S.V., Kazieva I.E., Martirosyan A.K. Clinical and experimental use osteoplastic materials combined with electromagnetic radiation to speed up the regeneration of

bone defects jaw. *Fundamental'nye issledovaniya* 2013; 5–2: 389–393.

67. Красножен В.Н., Покровская Е.М., Михалин А.Н. Клиническое обоснование применения полимерных имплантов в восстановлении костных дефектов околоносовых пазух. *Российская ринология* 2013; 21(2): 12–13. Krasnozhen V.N., Pokrovskaya E.M., Mikhailin A.N. The clinical rationale for the use of polymeric implant in the reconstruction of bone defects of the paranasal sinuses. *Rossiyskaya rinologiya* 2013; 21(2): 12–13.

68. Покровская Е.М. Использование полимерных имплантов в реконструктивной хирургии околоносовых пазух (экспериментальное исследование). *Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки* 2014; 16(5–4): 1415–1417. Pokrovskaya E.M. Using the polymeric implants in reconstructive surgery of paranasal sinuses (experimental research). *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk. Sotsial'nye, humanitarnye, mediko-biologicheskie nauki* 2014; 16(5–4): 1415–1417.

69. Patlolla A., Arinze T.L. Evaluating apatite formation and osteogenic activity of electrospun composites for bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2014; 111(5): 1000–1017, <https://doi.org/10.1002/bit.25146>.

70. Galois L., Mainard D., Delagoutte J.P. Beta-tricalcium phosphate ceramic as a bone substitute in orthopaedic surgery. *Int Orthop* 2002; 26(2): 109–115, <https://doi.org/10.1007/s00264-001-0329-x>.

71. Gaasbeek R.D., Toonen H.G., van Heerwaarden R.J., Buma P. Mechanism of bone incorporation of beta-TCP bone substitute in open wedge tibial osteotomy in patients. *Biomaterials* 2005; 26(33): 6713–6719, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.056>.

72. Koerten H.K., van der Meulen J. Degradation of calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 1999; 44(1): 78–86, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199901\)44:1<78::aid-jbm9>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199901)44:1<78::aid-jbm9>3.0.co;2-6).

73. Malhotra A., Habibovic P. Calcium phosphates and angiogenesis: implications and advances for bone regeneration. *Trends Biotechnol* 2016; 34(12): 983–992, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.07.005>.

74. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000; 31(Suppl 4): 37–47, [https://doi.org/10.1016/s0020-1383\(00\)80022-4](https://doi.org/10.1016/s0020-1383(00)80022-4).

75. Chazono M., Tanaka T., Komaki H., Fujii K. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70(4): 542–549, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30094>.

76. Spivak J.M., Hasharoni A. Use of hydroxyapatite in spine surgery. *Eur Spine J* 2001; 10(Suppl 2): S197–S204, <https://doi.org/10.1007/s005860100286>.

77. Bansal R., Patil S., Chaubey K.K., Thakur R.K., Goyal P. Clinical evaluation of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate composite graft in the treatment of intrabony periodontal defect: a clinico-radiographic study. *J Indian Soc Periodontol* 2014; 18(5): 610–617, <https://doi.org/10.4103/0972-124x.142455>.

78. Rahaman M.N., Day D.E., Bal B.S., Fu Q., Jung S.B., Bonewald L.F., Tomsia A.P. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater* 2011; 7(6): 2355–2373, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>.

79. El-Fiqi A., Lee J.H., Lee E.J., Kim H.W. Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: improvement of physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering. *Acta Biomater* 2013; 9(12): 9508–9521, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.07.036>.

80. Silva A.R., Paula A.C., Martins T.M., Goes A.M., Pereria M.M. Synergistic effect between bioactive glass foam and a perfusion bioreactor on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(3): 818–827, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34758>.

81. van Gestel N.A., Geurts J., Hulsen D.J., van Rietbergen B., Hofmann S., Arts J.J. Clinical applications of S53P4 bioactive glass in bone healing and osteomyelitic treatment: a literature review. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 684826, <https://doi.org/10.1155/2015/684826>.

82. Leppäranta O., Vaahtio M., Peltola T., Zhang D., Hupa L., Hupa M., Ylänen H., Salonen J.I., Viljanen M.K., Eerola E. Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(2): 547–551, <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3018-5>.

83. Zhang D., Leppäranta O., Munukka E., Ylänen H., Viljanen M.K., Eerola E., Hupa M., Hupa L. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *J Biomed Mater Res A* 2010; 93(2): 475–483, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32564>.

84. Félix Lanao R.P., Jonker A.M., Wolke J.G., Jansen J.A., van Hest J.C., Leeuwenburgh S.C. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; 19(4): 380–390, <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0443>.

85. Yoshioka T., Kawazoe N., Tateishi T., Chen G. In vitro evaluation of biodegradation of poly (lactic-co-glycolic acid) sponges. *Biomaterials* 2008; 29(24–25): 3438–3443, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.011>.

86. Félix Lanao R.P., Leeuwenburgh S.C., Wolke J.G., Jansen J.A. In vitro degradation rate of apatitic calcium phosphate cement with incorporated PLGA microspheres. *Acta Biomater* 2011; 7(9): 3459–3468, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.036>.

87. Wang J., Yu X. Preparation, characterization and in vitro analysis of novel structured nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2010; 6(8): 3004–3012, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.045>.

88. Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J.E. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* 2014; 14(1): 15–56, <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>.

89. Hannink G., Arts J.J. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury* 2011; 42(Suppl 2): S22–S25, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.008>.

90. Neman J., Hambrecht A., Cadry C., Jandial R. Stem cell-mediated osteogenesis: therapeutic potential for bone tissue engineering. *Biologics* 2012; 6: 47–57, <https://doi.org/10.2147/btt.s22407>.

91. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5474–5491, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.

92. Tsuruga E., Takita H., Itoh H., Wakisaka Y., Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997; 121(2): 317–324, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021589>.

93. Itälä A.I., Ylänen H.O., Ekholm C., Karlsson K.H., Aro H.T. Pore diameter of more than 100 micron is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res* 2001; 58(6): 679–683, <https://doi.org/10.1002/jbm.1069>.
94. Blokhuis T.J., Termaat M.F., den Boer F.C., Patka P., Bakker F.C., Haarman H.J. Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior. *J Trauma* 2000; 48(1): 179–186, <https://doi.org/10.1097/00005373-200001000-00037>.
95. Qi X., Pei P., Zhu M., Du X., Xin C., Zhao S., Li X., Zhu Y. Three dimensional printing of calcium sulfate and mesoporous bioactive glass scaffolds for improving bone regeneration in vitro and in vivo. *Sci Rep* 2017; 7(1): 42556, <https://doi.org/10.1038/srep42556>.
96. Lee J.W., Kang K.S., Lee S.H., Kim J.Y., Lee B.K., Cho D.W. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly(propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres. *Biomaterials* 2011; 32(3): 744–752, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.035>.
97. Wiria F.E., Leong K.F., Chua C.K., Liu Y. Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. *Acta Biomater* 2007; 3(1): 1–12, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.07.008>.
98. Fielding G.A., Bandyopadhyay A., Bose S. Effects of silica and zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds. *Dent Mater* 2012; 28(2): 113–122, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.09.010>.
99. Park S.A., Lee S.H., Kim W.D. Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. *Bioprocess Biosyst Eng* 2011; 34(4): 505–513, <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0499-2>.
100. Lieder R., Sigurjonsson O.E. The effect of recombinant human interleukin-6 on osteogenic differentiation and YKL-40 expression in human, bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biores Open Access* 2014; 3(1): 29–34, <https://doi.org/10.1089/biores.2013.0035>.
101. Bueno E.M., Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5(12): 685–697, <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.228>.
102. Kiernan C.H., Wolvius E.B., Brama P.A.J., Farrell E. The immune response to allogeneic differentiated mesenchymal stem cells in the context of bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2018; 24(1): 75–83, <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0175>.
103. Granero-Moltó F., Weis J.A., Miga M.I., Landis B., Myers T.J., O'Rear L., Longobardi L., Jansen E.D., Mortlock D.P., Spagnoli A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 2009; 27(8): 1887–1898, <https://doi.org/10.1002/stem.103>.
104. Bartholomew A., Polchert D., Szilagyi E., Douglas G.W., Kenyon N. Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance. *Transplantation* 2009; 87 (9 Suppl): S55–S57, <https://doi.org/10.1097/tp.0b013e3181a287e6>.
105. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roelofs H., Lewis I., Lanino E., Sundberg B., Bernardo M.E., Remberger M., Dini G., Egeler R.M., Bacigalupo A., Fibbe W., Ringden O.; Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371(9624): 1579–1586, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60690-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60690-x).
106. Qin Y., Guan J., Zhang C. Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration. *Postgrad Med J* 2014; 90(1069): 643–647, <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2013-132387>.
107. Tang Z.B., Cao J.K., Wen N., Wang H.B., Zhang Z.W., Liu Z.Q., Zhou J., Duan C.M., Cui F.Z., Wang C.Y. Posterolateral spinal fusion with nano-hydroxyapatite-collagen/PLA composite and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; 6(4): 325–336, <https://doi.org/10.1002/term.445>.
108. Lee T.H., Huang Y.H., Chang N.K., Lin W.C., Chien P.W., Su T.M., Hsieh D.J., Lee T.C. Characterization and spinal fusion effect of rabbit mesenchymal stem cells. *BMC Res Notes* 2013; 6(1): 528, <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-528>.
109. Liu G., Zhao L., Zhang W., Cui L., Liu W., Cao Y. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(6): 2367–2376, <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3348-3>.
110. Giannoni P., Mastrogiacomo M., Alini M., Pearce S.G., Corsi A., Santolini F., Muraglia A., Bianco P., Cancedda R. Regeneration of large bone defects in sheep using bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2(5): 253–262, <https://doi.org/10.1002/term.90>.
111. Dumas A., Moreau M.F., Ghérandi R.K., Baslé M.F., Chappard D. Bone grafts cultured with bone marrow stromal cells for the repair of critical bone defects: an experimental study in mice. *J Biomed Mater Res A* 2009; 90(4): 1218–1229, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32176>.
112. Xu J.Z., Qin H., Wang X.Q., Zhou Q., Luo F., Hou T.Y., He Q.Y. Repair of large segmental bone defects using bone marrow stromal cells with demineralized bone matrix. *Orthop Surg* 2009; 1(1): 34–41, <https://doi.org/10.1111/j.2757-7861.2008.00007.x>.
113. Nair M.B., Varma H.K., Menon K.V., Shenoy S.J., John A. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. *Acta Biomater* 2009; 5(5): 1742–1755, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.009>.
114. Chang S.C., Lin T.M., Chung H.Y., Chen P.K., Lin F.H., Lou J., Jeng L.B. Large-scale bicortical skull bone regeneration using ex vivo replication-defective adenoviral-mediated bone morphogenetic protein-2 gene-transferred bone marrow stromal cells and composite biomaterials. *Neurosurgery* 2009; 65(6 Suppl): 75–81, <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000345947.33730.91>.
115. Chang S.C., Chung H.Y., Tai C.L., Chen P.K., Lin T.M., Jeng L.B. Repair of large cranial defects by hBMP-2 expressing bone marrow stromal cells: comparison between alginate and collagen type I systems. *J Biomed Mater Res A* 2010; 94(2): 433–441, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32685>.
116. Xiao C., Zhou H., Ge S., Tang T., Hou H., Luo M., Fan X. Repair of orbital wall defects using biocoral scaffolds combined with bone marrow stem cells enhanced by human bone morphogenetic protein-2 in a canine model. *Int J Mol Med* 2010; 26(4): 517–525, https://doi.org/10.3892/ijmm_00000494.
117. Zhou H., Deng Y., Bi X., Xiao C., Wang Y., Sun J., Gu P., Fan X. Orbital wall repair in canines with beta-tricalcium phosphate and induced bone marrow stromal cells. *J Biomed*

Mater Res B Appl Biomater 2013; 101(8): 1340–1349, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32951>.

118. Gardel L., Afonso M., Frias C., Gomes M., Reis R. Assessing the repair of critical size bone defects performed in a goat tibia model using tissue-engineered constructs cultured in a bidirectional flow perfusion bioreactor. *J Biomater Appl* 2014; 29(2): 172–185, <https://doi.org/10.1177/0885328213519351>.

119. Fernandes M.B., Guimarães J.A., Casado P.L., Cavalcanti Ados S., Gonçalves N.N., Ambrósio C.E., Rodrigues F., Pinto A.C., Miglino M.A., Duarte M.E. The effect of bone allografts combined with bone marrow stromal cells on the healing of segmental bone defects in a sheep model. *BMC Vet Res* 2014; 10(1): 36, <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-36>.

120. Ronca A., Guarino V., Raucchi M.G., Salamanna F., Martini L., Zeppetelli S., Fini M., Kon E., Filardo G., Marcacci M., Ambrosio L. Large defect-tailored composite scaffolds for in vivo bone regeneration. *J Biomater Appl* 2014; 29(5): 715–727, <https://doi.org/10.1177/0885328214539823>.

121. Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Kutevov S.M., Mukhachev V., Lavroukov A., Kon E., Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001; 344(5): 385–386, <https://doi.org/10.1056/nejm200102013440516>.

122. Marcacci M., Kon E., Moukachev V., Lavroukov A., Kutevov S., Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007; 13(5): 947–955, <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0271>.

123. Tolar J., Nauta A.J., Osborn M.J., Panoskaltis Mortari A., McElmurry R.T., Bell S., Xia L., Zhou N., Riddle M., Schroeder T.M., Westendorf J.J., Mclvor R.S., Hogendoorn P.C., Szuhai K., Oseth L., Hirsch B., Yant S.R., Kay M.A., Peister A., Prockop D.J., Fibbe W.E., Blazar B.R. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; 25(2): 371–379, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0620>.

124. Tasso R., Augello A., Carida' M., Postiglione F., Tibiletti M.G., Bernasconi B., Astigiano S., Fais F., Truini M., Cancedda R., Pennesi G. Development of sarcomas in mice implanted with mesenchymal stem cells seeded onto bioscaffolds. *Carcinogenesis* 2009; 30(1): 150–157, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn234>.

125. Hustedt J.W., Jegede K.A., Badrinath R., Bohl D.D., Blizzard D.J., Grauer J.N. Optimal aspiration volume of vertebral bone marrow for use in spinal fusion. *Spine J* 2013; 13(10): 1217–1222, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.07.435>.

126. Liu H.C., E L.L., Wang D.S., Su F., Wu X., Shi Z.P., Lv Y., Wang J.Z. Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Eng Part A* 2011; 17(19–20): 2417–2433, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0620>.

127. Lavery K., Swain P., Falb D., Alaoui-Ismaili M.H. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 2008; 283(30): 20948–20958, <https://doi.org/10.1074/jbc.m800850200>.

128. Egermann M., Lill C.A., Griesbeck K., Evans C.H., Robbins P.D., Schneider E., Baltzer A.W. Effect of BMP-2 gene

transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther* 2006; 13(17): 1290–1299, <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302785>.

129. Lee S.S., Huang B.J., Kaltz S.R., Sur S., Newcomb C.J., Stock S.R., Shah R.N., Stupp S.I. Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds. *Biomaterials* 2013; 34(2): 452–459, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.005>.

130. Yang F., Wang J., Hou J., Guo H., Liu C. Bone regeneration using cell-mediated responsive degradable PEG-based scaffolds incorporating with rhBMP-2. *Biomaterials* 2013; 34(5): 1514–1528, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.058>.

131. Cha J.K., Lee J.S., Kim M.S., Choi S.H., Cho K.S., Jung U.W. Sinus augmentation using BMP-2 in a bovine hydroxyapatite/collagen carrier in dogs. *J Clin Periodontol* 2014; 41(1): 86–93, <https://doi.org/10.1111/jcpe.12174>.

132. Jang J.W., Yun J.H., Lee K.I., Jang J.W., Jung U.W., Kim C.S., Choi S.H., Cho K.S. Osteoinductive activity of biphasic calcium phosphate with different rhBMP-2 doses in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113(4): 480–487, <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.04.013>.

133. Schwender J.D., Holly L., Rouben D.P., Foley K.T. Minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion (TLIF): technical feasibility and initial results. *J Spinal Disord Tech* 2005; 18(S1): S1–S6, <https://doi.org/10.1097/01.bsd.0000132291.50455.d0>.

134. Lewandrowski K.U., Nanson C., Calderon R. Vertebral osteolysis after posterior interbody lumbar fusion with recombinant human bone morphogenetic protein 2: a report of five cases. *Spine J* 2007; 7(5): 609–614, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2007.01.011>.

135. Shields L.B., Raque G.H., Glassman S.D., Campbell M., Vitaz T., Harpring J., Shields C.B. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine* 2006; 31(5): 542–547, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000201424.27509.72>.

136. Vaidya R., Weir R., Sethi A., Meisterling S., Hakeos W., Wybo C.D. Interbody fusion with allograft and rhBMP-2 leads to consistent fusion but early subsidence. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89(3): 342–345, <https://doi.org/10.1302/0301-620x.89b3.18270>.

137. Mesfin A., Buchowski J.M., Zebala L.P., Bakhsh W.R., Aronson A.B., Fogelson J.L., Hershman S., Kim H.J., Ahmad A., Bridwell K.H. High-dose rhBMP-2 for adults: major and minor complications: a study of 502 spine cases. *J Bone Joint Surg Am* 2013; 95(17): 1546–1553, <https://doi.org/10.2106/jbjs.l.01730>.

138. Moshel Y.A., Hernandez E.I., Kong L., Liu C., Samadani U. Acute renal insufficiency, supraventricular tachycardia, and confusion after recombinant human bone morphogenetic protein-2 implantation for lumbosacral spine fusion. *J Neurosurg Spine* 2008; 8(6): 589–593, <https://doi.org/10.3171/spi/2008/8/6/589>.

139. Fu R., Selph S., McDonagh M., Peterson K., Tiwari A., Chou R., Helfand M. Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2013; 158(12): 890–902, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-12-201306180-00006>.

140. Guo X., Zheng Q., Kulbatski I., Yuan Q., Yang S., Shao Z., Wang H., Xiao B., Pan Z., Tang S. Bone regeneration

- with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous beta-TCP ceramic scaffolds. *Biomed Mater* 2006; 1(3): 93–99, <https://doi.org/10.1088/1748-6041/1/3/001>.
141. Maehara H., Sotome S., Yoshii T., Torigoe I., Kawasaki Y., Sugata Y., Yuasa M., Hirano M., Mochizuki N., Kikuchi M., Shinomiya K., Okawa A. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res* 2010; 28(5): 677–686, <https://doi.org/10.1002/jor.21032>.
142. Hollinger J.O., Hart C.E., Hirsch S.N., Lynch S., Friedlaender G.E. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90(Suppl 1): 48–54, <https://doi.org/10.2106/jbjs.g.01231>.
143. Lieberman J.R., Daluiski A., Einhorn T.A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84(6): 1032–1044, <https://doi.org/10.2106/00004623-200206000-00022>.
144. Graham S., Leonidou A., Lester M., Heliotis M., Mantalaris A., Tsiridis E. Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18(11): 1633–1654, <https://doi.org/10.1517/13543780903241607>.
145. Luvizuto E.R., Tangl S., Dobsak T., Reich K., Gruber R., Sonoda C.K., Okamoto R. Effect of recombinant PDGF-BB on bone formation in the presence of β -tricalcium phosphate and bovine bone mineral matrix: a pilot study in rat calvarial defects. *BMC Oral Health* 2016; 16(1): 52, <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0210-3>.
146. Zhao L., Jiang S., Hantash B.M. Transforming growth factor β 1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(2): 725–733, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0495>.
147. Kwok S., Partridge N.C., Srinivasan N., Nair S.V., Selvamurugan N. Mitogen-activated protein kinase-dependent inhibition of osteocalcin gene expression by transforming growth factor- β 1. *J Cell Biochem* 2009; 106(1): 161–169, <https://doi.org/10.1002/jcb.21991>.
148. Zhang H., Ahmad M., Gronowicz G. Effects of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials. *Biomaterials* 2003; 24(12): 2013–2020, [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00616-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00616-6).
149. Alliston T., Choy L., Ducey P., Karsenty G., Derynck R. TGF- β -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 2001; 20(9): 2254–2272, <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2254>.
150. Kaji H., Naito J., Sowa H., Sugimoto T., Chihara K. Smad3 differently affects osteoblast differentiation depending upon its differentiation stage. *Horm Metab Res* 2006; 38(11): 740–745, <https://doi.org/10.1055/s-2006-955085>.
151. Centrella M., Ji C., Casinighino S., McCarthy T.L. Rapid flux in transforming growth factor- β receptors on bone cells. *J Biol Chem* 1996; 271(31): 18616–18622, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18616>.
152. Ochiai H., Yamamoto Y., Yokoyama A., Yamashita H., Matsuzaka K., Abe S., Azuma T. Dual nature of TGF- β 1 in osteoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *J Hard Tissue Biol* 2010; 19(3): 187–191, <https://doi.org/10.2485/jhtb.19.187>.
153. Ochiai H., Okada S., Saito A., Hoshi K., Yamashita H., Takato T., Azuma T. Inhibition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression by prolonged transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) administration suppresses osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2012; 287(27): 22654–22661, <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.279091>.
154. Lau K.H., Kapur S., Kesavan C., Baylink D.J. Up-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. *J Biol Chem* 2006; 281(14): 9576–9588, <https://doi.org/10.1074/jbc.M509205200>.
155. Lean J.M., Mackay A.G., Chow J.W., Chambers T.J. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *Am J Physiol* 1996; 270(6 Pt1): 937–945, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.270.6.e937>.
156. Kawata A., Mikuni-Takagaki Y. Mechanotransduction in stretched osteocytes — temporal expression of immediate early and other genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246(2): 404–408, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8632>.
157. Reijnders C.M., Bravenboer N., Tromp A.M., Blankenstein M.A., Lips P. Effect of mechanical loading on insulin-like growth factor-I gene expression in rat tibia. *J Endocrinol* 2007; 192(1): 131–140, <https://doi.org/10.1677/joe.1.06880>.
158. Sakata T., Wang Y., Halloran B.P., Elalieh H.Z., Cao J., Bikle D.D. Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor-I (IGF-I) by inhibiting activation of the IGF-I signaling pathways. *J Bone Miner Res* 2004; 19(3): 436–446, <https://doi.org/10.1359/jbmr.0301241>.
159. Kesavan C., Wergedal J.E., Lau K.H., Mohan S. Conditional disruption of IGF-I gene in type 1alpha collagen-expressing cells shows an essential role of IGF-I in skeletal anabolic response to loading. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301(6): E1191–E1197, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00440.2011>.
160. Sheng M.H., Lau K.H., Baylink D.J. Role of osteocyte-derived insulin-like growth factor i in developmental growth, modeling, remodeling, and regeneration of the bone. *J Bone Metab* 2014; 21(1): 41–54, <https://doi.org/10.11005/jbm.2014.21.1.41>.
161. Geiger F., Lorenz H., Xu W., Szalay K., Kasten P., Claes L., Augat P., Richter W. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone* 2007; 41(4): 516–522, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.06.018>.
162. Wernike E., Montjovent M.O., Liu Y., Wismeijer D., Hunziker E.B., Siebenrock K.A., Hofstetter W., Klenke F. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *Eur Cell Mater* 2010; 19: 30–40, <https://doi.org/10.22203/ecm.v019a04>.
163. Maes C., Coenegrachts L., Stockmans I., Daci E., Luttun A., Petryk A., Gopalakrishnan R., Moermans K., Smets N., Verfaillie C., Carmeliet P., Bouillon R., Carmeliet G. Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover, and bone remodeling during fracture repair. *J Clin Invest* 2006; 116(5): 1230–1242, <https://doi.org/10.1172/jci26772>.
164. McCoy R.J., Widaa A., Watters K.M., Wuerstle M.,

Stallings R.L., Duffy G.P., O'Brien F.J. Orchestrating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells — identification of placental growth factor as a mechanosensitive gene with a pro-osteogenic role. *Stem Cells* 2013; 31(11): 2420–2431, <https://doi.org/10.1002/stem.1482>.

165. Liu Y., Deng L.Z., Sun H.P., Xu J.Y., Li Y.M., Xie X., Zhang L.M., Deng F.L. Sustained dual release of placental growth factor-2 and bone morphogenic protein-2 from heparin-based nanocomplexes for direct osteogenesis. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 1147–1158, <https://doi.org/10.2147/ijn.s100156>.

166. Kadam A., Millhouse P.W., Kepler C.K., Radcliff K.E., Fehlings M.G., Janssen M.E., Sasso R.C., Benedict J.J., Vaccaro A.R. Bone substitutes and expanders in spine surgery:

a review of their fusion efficacies. *Int J Spine Surg* 2016; 10: 33, <https://doi.org/10.14444/3033>.

167. Ghassemi T., Shahroodi A., Ebrahimzadeh M.H., Mousavian A., Movaffagh J., Moradi A. Current concepts in scaffolding for bone tissue engineering. *Arch Bone Jt Surg* 2018; 6(2): 90–99.

168. Chen W., Liu X., Chen Q., Bao C., Zhao L., Zhu Z., Xu H.H.K. Angiogenic and osteogenic regeneration in rats via calcium phosphate scaffold and endothelial cell co-culture with human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), human umbilical cord MSCs, human induced pluripotent stem cell-derived MSCs and human embryonic stem cell-derived MSCs. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12(1): 191–203, <https://doi.org/10.1002/term.2395>.