

КОСТНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТИ

Предеин Ю.А.¹, Рерих В.В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, e-mail: Predein.y.a@ya.ru;

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск

В данном обзоре рассмотрены современные способы замещения костных дефектов, в основе которых лежит использование имплантатов, мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и биоактивных веществ. Тканеинженерные конструкции рассмотрены как альтернатива аутопластике, которая является золотым стандартом при замещении дефектов кости. Выявлены преимущества и недостатки используемых пластических материалов для замещения костных дефектов при реконструктивных операциях на опорно-двигательном аппарате. Особое значение придается актуальному на сегодняшний день направлению – использованию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, которые являются наиболее распространенными клетками, применяемыми для регенерации костной ткани. А также описаны некоторые источники их выделения и способы дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в остеогенном направлении. Описан опыт использования методов тканевой инженерии с применением клеточных конструкций для коррекции патологии опорно-двигательного аппарата.

Ключевые слова: имплантат, дефект костной ткани, клеточные технологии, лечение, хирургия, кость, тканевая инженерия

BONE AND CELLULAR IMPLANTS FOR REPLACEMENT BONE DEFECTS

Predein Y.A.¹, Rerih V.V.¹

¹Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, e-mail: Predein.y.a@ya.ru;

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

This review deals with modern methods for substitution of bone defects, which are based on the use of the implant, stem cells and bioactive substances. Tissue-engineering design considered as an alternative autoplasty, which is the «gold standard» for replacement of bone defects. The advantages and disadvantages of plastic materials used to fill bone defects in reconstructive surgery on the musculoskeletal system. Particular importance is attached-to-date direction - the use of multipotent mesenchymal stromal cells, which are the most common cells applicable for the regeneration of bone tissue. And also describes some of the sources of their allocation and methods of differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells into osteogenic direction. We describe the experience of using tissue engineering techniques using cell designs for the correction of the pathology of the musculoskeletal system.

Keywords: implant, bone defect, cellular technology, treatment, surgery, bone tissue engineering

Каждый день в мире выполняется множество хирургических вмешательств для лечения деформаций и переломов позвоночника. Современные стратегии регенеративной медицины направлены на восстановление архитектуры патологически измененной ткани путем замещения костного дефекта имплантатом, помещенным в зону повреждения. Тем самым сокращаются сроки восстановления трудоспособности и повышается качество жизни пациента. С этой целью объединяются различные технологии, чтобы создать пластический материал, который будет превосходить по своим данным так называемый золотой стандарт – аутокость. На данный момент активно используются имплантаты из различных материалов,

как биологических, так и синтетических, для замещения костных дефектов. К сожалению, нет идеального имплантата, удовлетворяющего всем требованиям, предъявляемым к пластическому материалу. Все они имеют свои преимущества и недостатки.

Цель исследования

Изучить основные характеристики костных и клеточных материалов для замещения дефектов костной ткани и перспективы их применения на основе данных литературы.

Материалы и методы исследования

В ходе проведения исследования был проанализирован международный опыт применения следующих основных пластических материалов, используемых для замещения костных дефектов: ауто- и аллотрансплантаты; костные морфогенетические белки; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; трехмерный хондротрансплантат. Выявленные при анализе литературных данных недостатки и преимущества пластических материалов позволяют наметить дальнейшие перспективные пути исследований.

Результаты и обсуждение

Во все времена считалось, что «золотым стандартом» для остеопластики являются аутооттрансплантаты, забор которых осуществляется из собственных тканей пациента, в связи с чем полностью исключаются основные иммунологические и большинство инфекционных осложнений при трансплантации [8]. *Костные аутооттрансплантаты* обладают не только osteoconductive свойствами, но и способностью индуцировать рост костной ткани в месте имплантации в связи с наличием в них остеогенных клеток [20]. Однако аутооттрансплантаты должны быть взяты непосредственно перед этапом замещения костного дефекта, что увеличивает время основного этапа операции. Помимо этого, возможный объем аутооттрансплантата весьма ограничен, и при его заборе донор зачастую подвергается серьезным оперативным вмешательствам [8, 20].

При изучении проблемы костной аутопластики нельзя исключить большое количество осложнений, связанных с местом взятия аутооттрансплантата. Самые распространенные среди выявленных осложнений — это хронические боли и расстройство чувствительности в области взятия трансплантата, что связано с повреждением подвздошно-пахового и кожного бедренного нервов. Также среди возможных видов осложнений упоминаются перелом кости (донорского места), развитие гематомы и ее инфицирование [17, 20, 31]. Для замещения костного дефекта крыла подвздошной кости и уменьшения косметических последствий описываются такие способы, как пластика гребня крыла подвздошной кости протезом из пористой керамики, аллоимплантатом [17, 26].

Также помимо описанных проблем с местом взятия аутооттрансплантата существует проблема физических характеристик аутооттрансплантатов, а именно – прочность. В ходе

процесса перестройки аутотрансплантаты теряют свою прочность, что может впоследствии приводить к потере полученной коррекции деформации позвоночника [21]. Ретроспективный анализ результатов использования аутотрансплантатов из гребня крыла подвздошной кости для замещения костных дефектов при операциях на позвоночнике показывает, что 2,8–4,7% осложнений получены в результате отторжения аутотрансплантатов ложем, миграции их из ложа позвоночника, лизиса, перелома и перестройки аутотрансплантатов, которые потребовали проведения ревизионных операций [15].

В попытках минимизировать осложнения, получаемые при костной пластике аутотрансплантатом, ученые пришли к использованию аллогенной донорской кости. *Аллокость*, как и аутотрансплантат, сохраняет способность к перестройке в органоспецифичную костную ткань, хотя это и занимает более длительный период времени. Аллоимпланты в большинстве случаев позволяют сформироваться органоспецифичной костной ткани без значительной потери коррекции. Однако сохранение в аллоимплантатах белковых компонентов донора может привести к аллергической и иммунной реакции у реципиента [14]. Данный фактор значительно ограничивает применение аллокости в качестве имплантатов для пластики дефектов тел позвонков.

В попытках избавиться от осложнений при использовании аллотрансплантатов пришли к использованию деминерализованного костного матрикса (ДКМ), который содержит протеины, стимулирующие остеогенез. Получают костный матрикс путем деминерализации костной ткани, в которой к концу процесса деминерализации сохраняется менее 5% кальцифицированной целлюлярной субстанции [13]. Деминерализованная кость не является такой эффективной в образовании новой кости, как эндогенная губчатая кость, но она имеет преимущество перед консервированной аллогенной костью. Преимуществами ДКМ являются стерильность и сниженная антигенность [13, 47]. Однако у ДКМ присутствует ряд существенных недостатков: в ряде случаев он может являться аллергеном, а также имеет низкую механическую прочность. Последний фактор не позволяет использовать данный пластический материал в виде фиксирующих имплантатов, поэтому ДКМ применяется в виде остеобразующей добавки [16].

Костные морфогенетические белки

Костные морфогенетические белки (Bone Morphogenetic Proteins – BMPs) являются трансмембранными димерными белками, которые были открыты Marshall R. Urist в 1965 г. По современным научным данным BMPs — это многофункциональные ростовые факторы, которые относятся к суперсемейству В-трансформирующего фактора роста. В настоящее время открыто 20 разновидностей BMPs, но только у BMP-2, 4, 6, 7 выявили значительные остеоиндуктивные свойства [27].

Местом локализации ВМР является внеклеточный соединительнотканый матрикс, содержащий остеопрогениторные и мезенхимные клетки. ВМРs синтезируются остеобластами, хондроцитами и их предшественниками. Точкой воздействия ВМРs являются рецепторы, располагающиеся на клеточной мембране. ВМРs оказывают значительное воздействие на регуляцию роста, дифференцировку и апоптоз различных типов клеток, включая остеобласты, эпителиальные и нервные клетки, хондробласты [27, 35]. ВМРs стимулируют увеличение числа клеток; ускоряют дифференцировку ММСК в остеобласты и хондробласты; увеличивают синтез остеокальцина; ускоряют синтез коллагена; повышают активность щелочной фосфатазы; стимулируют синтез внеклеточного матрикса и его последующую минерализацию [35]. Клетки, участвующие в процессе синтеза костной ткани, являются клетками-мишенями для ВМРs: фибробласты, остеобласты, миобласты, нервные клетки, плюрипотентные мезенхимные стволовые клетки, маркеры костного метаболизма — остеопонин, остеокальцин, щелочная фосфатаза, остеоонектин [27]. Остеогенез, который осуществляется при помощи ВМРs, — это цепь последовательных событий с такими главными стадиями, как хемотаксис, быстрое деление мезенхимных остеопрогениторных клеток, дифференцировка мезенхимных стволовых клеток в хондробласты и формирование хряща, ангиогенез и синтез внеклеточного матрикса, замена хряща на костную ткань [23, 44]. Принимая участие в процессах хондрогенеза и остеогенеза, ВМРs оказывают стимулирующее воздействие на образование костной ткани, делая это в последовательности, схожей с эмбриональным морфогенезом [44].

Методами получения ВМРs являются два технологических процесса — это его биохимическая экстракция из деминерализованного костного матрикса, который являлся основным в 1990-е гг., и генно-инженерный синтез (rhВМРs), который активно используется в наше время [35].

В качестве носителей для ВМРs на сегодняшний день используются различные материалы, такие как деминерализованный костный матрикс, коллагеновые губки, хитозан, желатин, гидроксиапатит. Главными задачами носителей являются не только доставка ВМРs в место их биологического действия, но и сохранение этих остеоиндукторов в зоне воздействия в течение длительного периода времени, необходимого для формирования новой кости, а также пролонгированная диффузия ВМРs в организме реципиента [49].

Лечебные свойства ВМРs представляют большой интерес в клинической практике при консолидации переломов костей, профилактике остеопороза, лечении костных дефектов челюстей и в аллокостной пластике костных дефектов [49].

При планировании лечения с использованием ВМРs необходимо учитывать такой фактор, как возраст реципиента, поскольку он напрямую влияет на биологический потенциал

многих факторов роста. Остеоиндуктивная способность BMPs снижается как минимум в 2 раза у пожилых пациентов, следовательно, требует более высоких доз, чтобы вызвать ощутимый стимулирующий эффект на образование костной ткани.

Jeon и коллеги в своем исследовании на группе из 23 пациентов с одномоментным ventральным вмешательством на трех уровнях обнаружили, что имплантация PEEK-кейджа с размещенным на нем rhBMP-2 приводит к положительному исходу оперативного лечения и отсутствию болевого синдрома в отдаленном послеоперационном периоде. Однако при этом выявлено эктопическое формирование кости у трех пациентов [30].

При использовании rhBMP-2 на коллагеновой губке ACS «Infuse» отмечен больший процент образования костного блока тел позвонков по сравнению с операциями, в которых был применен аутологичный трансплантат из гребня подвздошной кости. Сообщается о получении костного блока у 94% из 143 больных [12], у 93% из 67 [25], у 99% из 21 [38], у 100% из 49 пациентов [43]. При этом отсутствовали осложнения, характерные для операции по взятию аутокости [12, 25, 38, 43].

В эксперименте на животных моделях был выполнен ventральный спондилодез на поясничном отделе позвоночника с использованием BMPs, при этом был получен больший процент костных сращений, чем при операциях с использованием аутоотрансплантата [34, 45, 48].

Baskin и коллеги использовали rhBMP-2 при ventральном межтеловом спондилодезе на шейном отделе позвоночника, сравнив его действие с аутоотрансплантатом из гребня подвздошной кости. Всем 33 пациентам из обеих групп проведено обследование спустя 24 месяца после операции. При этом выявлено, что группа с имплантацией rhBMP-2 имела более выраженный болевой синдром в шейном отделе позвоночника и верхних конечностях, чем группа с использованием аутоотрансплантата, которая не имела никаких осложнений, относящихся к области спондилодеза [9].

Мультитипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК)

В настоящее время исследования в области регенерации костной ткани ведутся с использованием эмбриональных стволовых, индуцированных плюрипотентных и стромальных стволовых клеток. Эмбриональные стволовые и индуцированные плюрипотентные клетки из-за проблем, связанных с онкогенностью, безопасностью и этикой, в клинической практике не применяются [33]. ММСК – это прогениторные клетки, способные к осуществлению дифференцировки в мезодермальные ткани, включая остеобласты, хондроциты, адипоциты. На данный момент активно используются при замещении костных дефектов ММСК, выделенные из жировой ткани, пульпы зуба, костного мозга.

ММСК, полученные из костного мозга, являются наиболее распространенными клетками, которые используются для регенерации костной ткани. Источником этих клеток является костный мозг. Одна из отличительных функций ММСК костного мозга — это формирование гемопозиндуцирующего и стромального микроокружения. Свойствами ММСК костного мозга являются фибробластоподобная морфология, способность к адгезии, легко индуцируемая дифференцировка в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях, а также высокий пролиферативный потенциал. Не менее важным свойством ММСК костного мозга является их способность к выработке большого количества биоактивных веществ, которые усиливают регенерацию тканей [46].

Альтернативой ММСК костного мозга могут выступать ММСК жировой ткани. Жировая ткань состоит из адипоцитов и гетерогенной популяции клеток – стромальной сосудистой фракции, которая окружает и поддерживает адипоциты. Данная фракция в свою очередь содержит преадипоциты, эндотелиальные клетки сосудов и их предшественники, Т- и В-лимфоциты, тучные клетки, макрофаги, а главное, ММСК. ММСК жировой ткани и костного мозга имеют схожий иммунофенотип, морфологию, а также способность к направленной дифференцировке [10].

Существует еще один источник ММСК – пульпа зуба. Данные клетки также могут дифференцироваться в остеогенном направлении и осуществлять регенерацию костной ткани, при этом их пролиферативная активность не менее высока, чем у ММСК костного мозга [24]. Взятие материала для получения этих клеток может быть выполнено во время стоматологических операций [22].

В настоящее время наиболее часто используемым источником ММСК является костный мозг, но процедура получения клеток представляет собой весьма инвазивную операцию, которая приводит к формированию костного дефекта в донорском участке. В отличие от этого жировую ткань можно получить наименее инвазивным способом во время липосакции или липэктомии [29].

В литературе встречаются неоднозначные результаты исследований остеогенного потенциала стромальных клеток из разных источников.

Ряд исследований показывает, что ММСК костного мозга имеют более высокий остеогенный потенциал, чем ММСК, полученные из жировой ткани [28, 39, 42]. При этом в других источниках встречаются данные, что ММСК, полученные из жировой ткани, имеют более высокий пролиферативный потенциал и низкий коэффициент старения, чем ММСК костного мозга, а также большую генетическую и морфологическую стабильность. Исследователи выявили, что способность к остеогенной дифференцировке ММСК, полученных из костного мозга, незначительно больше, чем ММСК жировой ткани [41]. В

связи с этим вопрос, какой тип ММСК больше подходит для решения задач тканевой инженерии по замещению дефектов кости, остается без ответа, и экспериментальные исследования по решению данной проблемы активно ведутся в данный момент.

Дифференцировка ММСК *in vitro* во многом зависит от условий их культивирования. Направить ММСК по пути остеогенной дифференцировки можно путем добавления в питательную среду различных веществ — индукторов остеогенеза. В эту группу веществ входят дексаметазон, аскорбиновая кислота, органические фосфаты, в частности р-глицерофосфат, дигидроксивитамин D3, некоторые белки семейства костных морфогенетических белков (BMP) [11].

При замещении костных дефектов используются методы тканевой инженерии, которые подразумевают совместное применение культивированных остеогенных клеток и материала-носителя. Носитель должен обеспечивать фиксацию культивированных клеток, адресную их доставку, стабильное нахождение в ложе реципиента и гистотипическую дифференцировку. Для реализации своих остеогенных функций полученные клетки должны определенное время находиться в фиксированном к носителю состоянии [11].

Рядом отечественных ученых в экспериментальных исследованиях с применением ММСК получена регенерация в модели дефекта костной ткани (на крысах) [6], с ММСК, иммобилизованными на аллокости (у кошек) [5], с ММСК в коллагеновом геле на модели дефекта большеберцовой кости (у кроликов) [1].

Arinze и коллеги описывают применение имплантатов из гидроксиапатита, заселенных аллогенной культурой ММСК, в эксперименте *in vivo* на собаках при моделировании перелома бедренной кости, при этом диастаз между отломками был замещен данным имплантатом. В результате применения этих имплантатов была получена регенерация костной ткани в месте перелома без инициации иммунологического ответа [13].

В исследованиях *in vivo* на овцах при моделировании перелома бедренной кости в диастаз между отломками помещали имплантат из гидроксиапатита, заселенный аутологичными ММСК. В этом случае также перелом консолидировался, при этом консолидированная кость не уступала по прочности неповрежденной [32].

Quarto и коллеги сообщили о клиническом исследовании пациентов с переломами костей конечностей с наличием дефекта 4–7 см. Пациентам замещали дефект кости имплантатом из макропористого гидроксиапатита, заселенного аутологичными ММСК, при этом имплантат соответствовал размеру дефекта. Пациентов наблюдали в течение 15–27 месяцев после имплантации, интеграция имплантата и консолидация перелома были выявлены через 2 месяца после операции [40].

Также Коn и коллеги по результатам 7-летнего наблюдения выявили, что дефекты длинных трубчатых костей, замещенные имплантатами из пористой керамики с гидроксиапатитным покрытием и заселенные аутологичными ММСК, восстановились с полной интеграцией имплантата в среднем за 7 месяцев. При этом имплантат не резорбировался и сохранил свою структуру даже через 7 лет после операции [37].

При замещении больших дефектов костной ткани с использованием различных тканеинженерных конструкций одной из основных проблем является обеспечение надлежащей трофики пересаженных клеток. Это критический этап всей технологии, поскольку в область костного дефекта вносятся жизнеспособные клетки, и без должного кровоснабжения можно ожидать гибель клеток. Имплантаты больших размеров в условиях *in vivo* испытывают дефицит кровоснабжения, в результате чего клетки, находящиеся на периферии имплантата и более плотно контактирующие с ложем, получают большее количество кислорода и питательных веществ, чем клетки, находящиеся в центральной части, как результат – гибель клеток в центральной части. Клетки, отдаленные от гемомикроциркуляторного русла более чем на 200–500 мкм, гибнут в ходе эксперимента, а костный матрикс замещается волокнистой соединительной тканью [19].

В последнее время все большее внимание уделяется модели артериовенозной петли, состоящей из артериального и венозного сосудов, искусственно анастомозированных аутовеной с помощью микрохирургической техники. 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 и таким путем открывает значительные перспективы в решении проблемы повышения выживаемости клеток, входящих в состав имплантатов [36].

Хондротрансплантат

В связи с активным развитием регенеративной медицины в последнее время проводится множество исследований по замещению дефектов тканей организма клеточными трансплантатами. В Новосибирском НИИТО был получен трехмерный хондротрансплантат, который представляет собой хондробласты, извлеченные из позвоночника новорожденного мини-поросенка, культивированные в питательной среде. Структурно-функциональная характеристика хондротрансплантата представляет собой хондробласты различной степени дифференцировки и внеклеточный матрикс. Среди хондробластов по классификации В.В. Серова, А.Б. Шехтера определялись юные, молодые, однако большее количество было представлено дифференцированными хондробластами. Внеклеточный матрикс хондротрансплантата был представлен агреканом, коллагеном I и II типов, в клетках и

матриксе были выявлены хондроитинсульфаты, а также фибронектин [2]. Дифференцировку клеток в хондрогенном направлении подтверждали морфологическими методами.

С использованием трехмерного хондротрансплантата был проведен эксперимент (на собаках) по замещению дефекта тела позвонка. По данным, полученным через 6 месяцев после имплантации: макроскопически границы костного дефекта тела позвонка не определяются, на его месте однородная костная ткань, по гистологическим данным дефект заполнен органоспецифической зрелой костной тканью, у которой межбалочные промежутки заполнены миелоидным мозгом. В контрольной группе за тот же период наблюдения на месте дефекта в теле позвонка сформирована грубая фиброзная ткань с редко расположенными костными структурами и сосудами [4].

Все вышеуказанное позволило авторам сделать вывод, что трехмерный хондротрансплантат обладает высокими регенераторными потенциями, которые реализуются за счет пролиферативной и синтетической активности, присущей эмбриональному хрящу.

Регенерация костной ткани на основе трехмерного хондротрансплантата осуществляется путем эволюционно закрепленного механизма энхондрального остеогенеза [3].

Недостатком трехмерного хондротрансплантата является то, что он не обладает достаточными прочностными свойствами, поэтому неприменим для регенерации значительных по площади дефектов костной ткани. Трехмерный хондротрансплантат может быть использован при лечении межпозвонкового остеохондроза, а также для замещения небольших по площади дефектов и повреждений костной ткани. Кроме того, к недостаткам трехмерного хондротрансплантата следует отнести необходимость его дополнительной фиксации в зоне трансплантации.

Заключение

На сегодняшний день методы тканевой инженерии для замещения костных дефектов клеточными культурами и биологически активными веществами существенно продвинулись от экспериментов к клиническому применению при реконструктивных операциях на опорно-двигательном аппарате. При замещении незначительных по размеру костных дефектов методами тканевой инженерии можно получить хорошие результаты, что доказано экспериментально и клинически. Однако пластика крупных костных дефектов на сегодняшний день все еще остается проблемой, которая связана с поддержанием жизнедеятельности клеточной культуры. В связи с этим необходимо продолжать разработки для совершенствования способов замещения костных дефектов с использованием методик тканевой инженерии.

Список литературы

1. Деев Р.В. Результаты трансплантации культуры аутогенных стромальных клеток костного мозга в область краевого дефекта длинных трубчатых костей / Деев Р.В., Цупкина Н.В., Иванов Д.Е. и др. // Травматология и ортопедия России. — 2007. — № 2(44). — С. 57–63.
2. Зайдман А.М. Культура хондробластов как потенциальный источник для тканевой инженерии при повреждениях и заболеваниях позвоночника / Зайдман А.М., Сахаров А.В., Колокольцева Т.Д. // Хирургия позвоночника. — 2004. — № 4. — С. 115–121.
3. Зайдман А.М., Тихонов В.Н. Использование хондротрансплантата от мини-свиней для межвидовой репаративной регенерации костной ткани // Биомедицина. — 2011. — № 4. — С. 34–36.
4. Зайдман А.М. Трехмерный хондротрансплантат – пластический материал для замещения дефектов костной ткани / Зайдман А.М., Щелкунова Е.И., Строкова Е.Л., Корель А.В., Рахматиллаев Ш.Н., Шевченко А.И. // Хирургия позвоночника. — 2012. — № 4. — С. 65–72.
5. Зорин В.Л. Способ восстановления целостности дефектов длинных трубчатых костей с использованием мезенхимальных стволовых клеток / Зорин В.Л., Крашенинников М.Е., Фролов В.И. и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2004. — № 1. — С. 37–40.
6. Фатхудинов Т.Х. Особенности репаративного остеогенеза при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток / Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В., Пулин А.А. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии. — 2005. — Т. 140, № 7. — С. 109–113.
7. Arinzeh T.L. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect / Arinzeh T.L., Peter S.J., Archambault M.P., van den Bos C., Gordon S., Kraus K., Smith A., Kadiyala S. // J Bone Joint Surgery. — 2003. — № 85-A. — P. 1927–1935.
8. Banwart J.C. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation / Banwart J.C., Asher M.A., Hassanein R.S. // Spine. — 1995. — № 20. — P. 1055–1060.
9. Baskin D.S. A prospective, randomized, controlled cervical fusion study using recombinant human bone morphogenetic protein-2 with the CORNERSTONE-SR allograft ring and the ATLANTIS anterior cervical plate / Baskin D.S., Ryan P., Sonntag V., Westmark R., Widmayer M.A. // Spine. — 2003. — № 28. — P. 1219–1224.
10. Bhumiratana S., Vunjak-Novakovic G. Concise review: personalized human bone grafts for reconstructing head and face. // Stem Cells Translational Medicine. — 2012. — № 1(1) — P. 64–69.

11. Birmingham E. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche / Birmingham E., Niebur G.L., McHugh P.E., Shaw G., Barry F.P., McNamara L.M. // *European Cells and Materials*. — 2012. — № 23. — P. 13–27.
12. Burkus J.K. Use of rhBMP-2 in combination with structural cortical allografts: clinical and radiographic outcomes in anterior lumbar spinal surgery / Burkus J.K., Sandhu H.S., Gornet M.F., Longley M.C. // *J. Bone and Joint Surgery*. — 2005. — Vol. 87A. N 6. — P. 1205–1212.
13. Cornell C.N., Lane J.M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. // *J Clinical Orthopaedics and Trauma*. — 1998. — № 355. — P. 267–273.
14. Di Bella C. Historical review of bone prefabrication / Di Bella C., Lucarelli E., Donati D. // *La Chirurgia degli organi di movimento*. — 2008. — № 92. — P. 73–78.
15. Dimar J.R. 2nd. Two-year fusion and clinical outcomes in 224 patients treated with a single-level instrumented posterolateral fusion with iliac crest bone graft / Dimar J.R. 2nd, Glassman S.D., Burkus J.K. et al. // *Spine*. — 2009. — № 9. — P. 880–885.
16. De Long W.G. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery / De Long W.G., Einhorn T.A., Koval K., McKee M., Smith W., Sanders R., Watson T. // *Bone and Joint Surgery*. — 2007. — № 89. — P. 649–658.
17. Ebraheim N.A. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications / Ebraheim N.A., Elgafy H., Xu R. // *American academy orthopaedic surgery*. — 2001. — № 9. — P. 210–218
18. Flynn L., Prestwich G.D., Semple J.L., Woodhouse K.A. Adipose tissue engineering with naturally derived scaffolds and adipose derived stem cells / Flynn L., Prestwich G.D., Semple J.L., Woodhouse K.A. // *Biomaterials*. — 2007. — № 28. — P. 3834–3842.
19. Folkman J. Self regulation of growth in three dimensions / Folkman J., Hochberg M. // *J Experimental Medicine*. — Vol. 138. — P. 745–753.
20. Friedlaender G.E. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications // *J Bone and Joint Surgery*. 1987. — № 69. — P. 786–790.
21. Grabowski G., Cornett C.A. Bone graft and bone graft substitutes in spine surgery: current concepts and controversies // *J American academy orthopaedic surgery*. — 2013. — № 21. — P. 51–60.
22. Grayson W.L. Engineering anatomically shaped human bone grafts / Grayson W.L., Frohlich M., Yeager K., Bhumiratana S., Chan M.E., Cannizzaro C., Wan L.Q., Liu X.S., Guo X.E., Vunjak-Novakovic G. // *Proc Natl Acad Sci USA* 2010. — № 107(8). — P. 3299–3304. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905439106>

23. Groeneveld E.H.J., Burger E.H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration // *European J Endocrinology*. — 2000. № 142. — P. 9–21.
24. Gronthos S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo / Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey P.G., Shi S. // *PNAS USA*. — 2000. — № 97(25). P. 13625–13630.
25. Haid R.W. Posterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2 with cylindrical interbody cages / Haid R.W., Branch C.L. Jr., Alexander J.T., Burkus J.K. // *Spine J*. — 2004. — Vol. 4. — P. 527–539.
26. Harris M.B. Iliac crest reconstruction after tricortical graft harvesting / Harris M.B., Davis J., Gertzbein S.D. // *J Spinal Disorders*. — 1994. — № 7. — P. 216–221.
27. Hustedt J.W. Optimal aspiration volume of vertebral bone marrow for use in spinal fusion / Hustedt J.W., Jegede K.A., Badrinath R., Bohl D.D., Blizzard D.J., Grauer J.N. // *Spine J*. — 2013. — № 13(10). — P. 1217–1222.
28. Im G.I. Do adipose tissue derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells / Im G.I., Shin Y.W., Lee K.B. // *Osteoarthritis Cartilage*. — 2005. — № 13(10). — P. 845–853.
29. Izadpanah R. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue / Izadpanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J. // *J Cellular Biochemistry*. — 2006. — № 99. — P. 1285–1212.
30. Jeon O. Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffold / Jeon O., Song S. J., Kang S. W., Putnam A. J., Kim B. S. // *J Biomaterials*. — 2007. — № 28. — P. 2763–2771.
31. Kim D.H. Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity / Kim D.H., Rhim R., Li L. et al. // *Spine J*. — 2009. — № 9. — P. 886–892.
32. Kon E. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones / Kon E., Muraglia A., Corsi A., Bianco P., Marcacci M., Martin I., Boyde A., Ruspantini I., Chistolini P., Rocca M., Giardino R., Cancedda R., Quarto R. // *J. Biomedical Materials Research*. — 2000. — № 49. — P. 328.
33. Kwong F.N. Chordin knockdown enhances the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells / Kwong F.N., Richardson S.M., Evans C.H. // *Arthritis Research & Therapy*. — 2008. — № 10. — P. 65.
34. Lewandrowski K.U. Vertebral osteolysis after posterior interbody lumbar fusion with recombinant human bone morphogenetic protein 2: a report of five cases / Lewandrowski K.U., Nanson C., Calderon R. // *Spine J*. — 2007. — № 75. — P. 609–614.

35. Liu H. C. Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite and collagen / Liu H. C., Wang D. S., Su F., Wu X., Shi Z. P., Wang J. Z. // *Tissue Engineering*. — 2011. — № 17. — P. 2417–2433.
36. Lokmic Z. An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue engineered construct / Z. Lokmic, F. Stillaert, W. Morrison et al. // *FASEB J*. — 2007. — Vol. 21, № 2. — P. 511–522.
37. Marcacci M. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study / Marcacci M., Kon E., Moukhachev V., Lavroukov A., Kutepov S., Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R. // *Tissue Engineering*. — 2007. — № 13. — P. 947–955.
38. Mummaneni P.V. Contribution of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to the rapid creation of interbody fusion when used in transforaminal lumbar interbody fusion: a preliminary report / Mummaneni P.V., Pan J., Haid R.W., Rodts G.E. // *J. Neurosurgery Spine*. — 2004. — № 1. — P. 19–23.
39. Noël D. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials / Noël D., Caton D., Roche S., Bony C., Lehmann S., Casteilla L., Jorgensen C., Cousin B. // *Experimental Cell Research J*. — 2008. — № 314. — P. 1575–1584.
40. Quarto R. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells / Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Kutepov S.M., Mukhachev V., Lavroukov A., Kon E., Marcacci M. // *New England J Medicine*. — 2001. — № 344. — P. 385–386.
41. Rath S.N. Adipose- and bone marrow derived mesenchymal stem cells display different osteogenic differentiation patterns in 3D bioactive glass-based scaffolds / Rath S.N., Noeaid P., Arkudas A., Beier J.P., Strobel L.A., Brandl A., Roether J.A., Horch R.E., Boccaccini A.R., Kneser U. // *J Tissue Engineering Regenerative Medicine*. — 2013. — № 3.
42. Sakaguchi Y. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source / Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T. // *Arthritis Rheum*. — 2005. — № 52(8). — P. 2521–2529.
43. Schwender J.D. Minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion(TLIF): technical feasibility and initial results / Schwender J.D., Holly L.T., Rouben D.P., Foley K.T. // *J Spine Disorders Techniques*. — 2005. — Vol. 18. — P. 1–6.
44. Seeherman H., Wozney J.M. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopaedic tissue regeneration // *Cytokine Growth Factor Reviews*. — 2005. — Vol. 16. — P. 329–345.

45. Shields L.B.E. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion / Shields L.B.E., Raque G.H., Glassman S.D., Campbell M., Vitaz T., Harpring J., Shields C.B. // *Spine*. — 2006. — № 31. — P. 542–547.
46. Strioga M. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells / Strioga M., Viswanathan S., Darinskas A., Slaby O., Michalek J. // *Stem Cells and Development*. — 2012. — № 21 (14). — P. 2724–2752.
47. Williams A., Szabo R.M. Bone transplantation. // *Orthopedics*. — 2004. — № 27. — P. 488–495, 496–487.
48. Vaidya R. Interbody fusion with allograft and rhBMP-2 leads to consistent fusion but early subsidence / Vaidya R., Weir R., Sethi A., Meisterling S., Hakeos W., Wybo C.D. // *J Bone Joint Surgery British*. — 2007. — № 89. — P. 342–345.
49. Yang F. Bone regeneration using cell-mediated responsive degradable PEG-based scaffolds incorporating with rhBMP-2 / Yang F., Wang J., Hou J., Guo H., Liu C. // *J Biomaterials*. — 2013. — № 34. — P. 1514–1528.