

## СПОНДИЛОДЕЗ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИСКУССТВЕННЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ КОСТНОЙ ТКАНИ И ФАКТОРОВ РОСТА

Аветисян А.Р.<sup>1</sup>, Рерих В.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: VRerih@niito.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск

Современные рутинные оперативные приемы в хирургии позвоночника требуют проведения различных вариантов спондилодеза с использованием пластических материалов. Настоящая работа посвящена сравнительному анализу эффективности применения искусственных заместителей костной ткани с факторами роста. Был проведен обзор научных статей по теме биокерамических заместителей костной ткани с остеоиндуктивными агентами. Был выполнен поиск в базе данных PubMed. Использовались следующие ключевые слова: bone graft substitutes, bone fusion, spine surgery, allografts, demineralized bone matrix, bioceramics, calcium sulfate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, hydroxyapatite, mesenchymal stem cells, rhBMP-2, rhBMP-2, autologous growth factors. Исследования на различных моделях спондилодеза показали, что частота гистологически подтвержденных случаев образования костного блока с применением синтетических заместителей костной ткани с факторами роста по сравнению с аутологичной костной тканью может быть даже больше. Охарактеризованы факторы роста и клеточные культуры, применяемые для улучшения остеогенности заместителей костной ткани. Предприняты эффективные экспериментальные попытки по снижению минимально необходимых доз rhBMP-2 и rhBMP-7 (имеющих дозозависимые побочные эффекты в клинической практике), заключающиеся в создании генно-инженерных векторов мезенхимальных стволовых клеток, экспрессирующих факторы роста, созданы химеры на основе rhBMP-2. Найден и апробирован новый фактор роста костной ткани NELL-1, превосходящий своими свойствами rhBMP-2.

Ключевые слова: остеокондукция, остеоиндукция, остеоинтеграция, факторы роста костной ткани, rhBMP-2, rhBMP-7, заместители костной ткани, кальцийфосфатная керамика

## SPINAL FUSION WITH THE USE OF ARTIFICIAL BONE SUBSTITUTES AND GROWTH FACTORS (LITERATURE REVIEW)

Avetisyan A.R.<sup>1</sup>, Rerikh V.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L.Tsivyana, Novosibirsk, e-mail: VRerih@niito.ru;

<sup>2</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

Modern routine surgical techniques in spinal surgery require a variety of spinal fusion using plastic materials. This paper is devoted to a comparative analysis of the effectiveness of the use of artificial bone tissue substitutes with growth factors. A review of scientific articles on the topic of bioceramic bone substitutes with osteoinductive agents was conducted. A search has been performed in the PubMed database. The following keywords were used: bone graft substitutes, bone fusion, spine surgery, allografts, demineralized bone matrix, bioceramics, calcium sulfate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, hydroxyapatite, mesenchymal stem cells, rhBMP-2, rhBMP-2, autologous growth factors. Studies on various models of spinal fusion showed that synthetic bone tissue substitutes, among which porous calcium phosphate ceramics are the most common, can be similar in efficiency and even exceed autologous bone tissue if they are loaded with osteoinductive agents (growth factors). In experimental practice were tested such factors as osteoinductive protein NeOsteo®, rhBMP-2, rhBMP-7, B2A2-K-NS peptide, NELL-1 growth factor. Among the cell cultures used to improve osteogenesis were found autologous bone marrow aspirate cells, cultured autologous stem mesenchymal cells and their modified vectors expressing rhBMP-7. Effective experimental attempts have been made to reduce the minimum required doses of rhBMP-2 and rhBMP-7 (with dose-dependent side effects in clinical practice), consisting in creating genetically engineered vectors of mesenchymal stem cells, expressing growth factors, and rhBMP-2-based chimeras have been created. A new bone tissue growth factor NELL-1 was found and tested, exceeding rhBMP-2 properties.

Keywords: osteoconduction, osteoinduction, osseointegration, bone growth factors, rhBMP-2, rhBMP-7, bone tissue substitutes, calcium phosphate ceramics

Современные рутинные оперативные приемы в хирургии позвоночника требуют проведения различных вариантов спондилодеза с использованием аутологичной костной

ткани [1, 2], аллогенной депротенизированной костной ткани или синтетических материалов [3, 4].

Аутологичная костная ткань долгое время считалась золотым стандартом для получения надежного блока, главным образом благодаря отличительной микроархитектуре и биологическим свойствам, которые обеспечивают идеальное соотношение остеоиндукции, остеоиндукции и остеогенности. Однако количество аутологичного костного трансплантата ограничено. Кроме того, существуют проблемы качества костной ткани у пациентов с остеопорозом, а также болезнь донорского места, наиболее часто проявляющаяся хроническим болевым синдромом в месте забора костной ткани. Кроме того, могут быть инфекционные осложнения и перелом кости, служащей источником костного трансплантата, при его большом объеме.

Все это вызвало бурное развитие индустрии искусственных заместителей костной ткани с формированием большого многообразия имплантатов, предлагаемых для экспериментальной апробации, а также и в клинической практике.

В настоящее время накоплен экспериментальный и клинический опыт применения различных синтетических заместителей костной ткани в сравнении с аутологичной костной тканью и другими хорошо апробированными заместителями, который целесообразно использовать в рутинной практике для принятия верных решений при определении клинической тактики [5, 6].

Из всего многообразия замещающих материалов трех основных классов веществ – металлы, полимеры, керамики – последние наиболее перспективны [7–9] в силу превосходящих физико-химических свойств, близких к аналогичным характеристикам костной ткани в силу высокой биосовместимости, безопасности и способности к остеоинтеграции [10–12].

Из широкого ряда керамических имплантатов, используемых для восполнения дефектов костной ткани, наибольшее практическое применение получила группа кальцийфосфатных керамик [13, 14].

Современные керамические заместители костной ткани близки к костной ткани своей архитектурой за счет сложной внутренней структуры из сообщающихся пор [15–17], также обладают способностью проводить костную ткань на своей поверхности (остеоиндукция) и могут быть носителями различных веществ [18–20]. В качестве последних применяются биологические активные субстанции [21, 22], способствующие клеточной дифференцировке предшественников остеобластов в костьпродуцирующую линию (факторы роста костной ткани), а также различные клеточные культуры [23–25], что позволяет достичь лучших результатов в инженерии костной ткани и является перспективной стратегией в наши дни

[26–28].

#### Цель исследования

Настоящая работа посвящена сравнительному анализу эффективности применения пористых биокерамических заместителей костной ткани с остеоиндуктивной нагрузкой.

#### Материалы и методы исследования

Был проведен обзор научных статей по теме биокерамических заместителей костной ткани с остеоиндуктивными агентами. Был выполнен поиск в базе данных PubMed на английском языке. Использовались следующие ключевые слова: bone graft substitutes, bone fusion, spine surgery, allografts, demineralized bone matrix, bioceramics, calcium sulfate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, hydroxyapatite, mesenchymal stem cells, rhBMP-2, rhBMP-2, autologous growth factors.

В сравнительный анализ эффективности применения пористых биокерамических заместителей костной ткани с остеоиндуктивными агентами были включены только те экспериментальные исследования, в которых были полно изложены методы и материалы исследования, включая методы статистического анализа данных, и где было проведено гистологическое подтверждение образования костного блока при проведении различных вариантов спондилодеза.

#### Результаты исследования и их обсуждение

##### *Пористая структура каркасных материалов, остеокондуктивность*

Каркасные имплантаты (scaffolds) отличаются сложноорганизованной внутренней архитектурой, которая представляет собой пространство из полостей (пор, каналов и пр.), размер которых и общий объем пространства (пористость) имеют большое значение.

Общий объем внутреннего пространства (или пористость) определяет наибольшее количество клеток, которое может поместиться в имплантате. В то же время чрезмерно высокая пористость снижает прочность каркасного имплантата и применимость на практике.

Размер пор определяет возможность передвижения клеток на поверхности имплантата и внутри него, их адгезии к стенке полости (поры), влияет на возможность транспорта питательных веществ и продуктов метаболизма.

Поры и каналы внутри имплантата могут иметь сообщения друг с другом (открытая пористость) или быть изолированными. В тканевой инженерии принципиально наличие открытой пористости у каркасного имплантата, позволяющей существовать сквозному току межклеточной жидкости, поддерживающей гомеостаз, миграцию клеток и рост ткани внутри имплантата [29, 30].

Имплантаты, поверхность которых способна быть проводником для роста и распространения костной ткани, называются остеокондуктивными. Так, по мнению S. Bose и

коллег, подобным свойством обладают пористые имплантаты с величиной пор от 100 до 600 мкм [31–33].

#### *Остеоиндуктивность и остеоинтеграция*

Остеоиндукция – это воздействие, способствующее пролиферации и дифференцировке предшественников в остеобласты, в свою очередь приводящее к формированию новой костной ткани. Биологически активные вещества, способные к остеоиндукции, называют факторами роста [34, 35].

Впервые остеоиндукцию описал М. R. Urist в 1965 г. на опыте с трансплантацией деминерализированной костной ткани в мышечный футляр лабораторного животного: спустя время после операции в трансплантационном ложе сформировалась костная ткань. Ему также удалось установить, что остеоиндукцию обеспечивали особые белки, в последующем названные костными морфогенетическими белками (bone morphogenetic proteins, BMP). Дальнейшие исследования обнаружили другие белки, стимулирующие рост костной ткани, которые вместе с костными морфогенетическими белками объединены в одну большую группу факторов роста (табл. 1).

По мнению R. Saranna и P. De Biase, клиническое применение факторов роста, в частности BMP, несколько лет назад представлялось невероятным. Но уже сейчас накоплены экспериментальные и клинические свидетельства новых возможностей в травматологии и ортопедии, появившихся с внедрением в экспериментальную практику факторов роста, позволяющих легко выйти из трудноразрешимой ситуации, создать наилучшие условия для формирования костной ткани, ускорить этот процесс.

Остеоинтеграцию имплантата впервые описали В. I. Branemark и соавторы в 1977 г. Т. Albrektsson и коллеги в 1981 г. определили этот термин как прямой контакт между костной тканью и имплантатом.

С позиций биомеханики признаком остеоинтеграции является асимптомная жесткая фиксация имплантата в кости при функциональной нагрузке.

Гистологически остеоинтеграция – это прямая якорная фиксация имплантата посредством формирования костной ткани вокруг него без развития фиброзной ткани на границе имплантат – кость [36].

Остеокондукция, остеоиндукция и остеоинтеграция – ключевые процессы, позволяющие достичь состоятельного костного блока с применением искусственных заместителей костной ткани.

Таблица 1

Сравнительная характеристика факторов роста [37]

Фактор роста	Локализация	Рецептор в мембране	Эффект
Трансформирующий $\beta$ -фактор роста	Тромбоциты, межклеточное вещество костной ткани, хрящевой матрикс	Серин-треонин-сульфат	Стимуляция пролиферации недифференцированных мезенхимальных клеток
Костными морфогенетическими белками	Остеогенные клетки, остеобласты, межклеточное вещество костной ткани	Серин-треонин-сульфат	Способствуют дифференцировке мезенхимальных клеток в хондроциты и остеобласты, а также остеогенных клеток в остеобласты
Фактор роста фибробластов	Макрофаги, мезенхимальные клетки, хондроциты, остеобласты	Тирозинкиназа	Увеличивает митотическую активность мезенхимальных клеток, хондроцитов и остеобластов
Инсулиноподобный фактор роста	Межклеточное вещество костной ткани, остеобласты, хондроциты	Тирозинкиназа	Способствует пролиферации и дифференцировке остеогенных клеток
Тромбоцитарный фактор роста	Тромбоциты, остеобласты	Тирозинкиназа	Увеличивает митотическую активность мезенхимальных клеток и остеобластов. Обеспечивает хемотаксис макрофагов

### *Клеточные культуры при замещении дефектов костной ткани*

Потенциальная возможность применения стволовых клеток очень бурно обсуждается в научной периодике в силу того, что эти клетки могут послужить источником для выращивания тканей и органов. Однако их использование сопряжено с широким рядом нерешенных научно-практических и этических проблем, особенно в случае применения эмбриональных стволовых клеток. Зрелые стволовые клетки, обладающие более ограниченным потенциалом к дифференцировке, по сравнению с эмбриональными являются более безопасными в силу меньшей тератогенности, и их получение и культивация более этичны.

Одной из разновидностей зрелых стволовых клеток являются мезенхимальные стволовые клетки, которые обнаруживаются в строме костного мозга. Они являются полипотентными клетками-предшественниками клеток различных тканей: костной, хрящевой, жировой, мышечной ткани и других.

Они имеют множество синонимов: стромальные клетки костного мозга, мультипотентные зрелые клетки-предшественники, стромальные стволовые клетки костного мозга, мезодермальные клетки-предшественники (Bone Marrow Stromal Cells, Multipotent Adult Progenitor Cells, Bone Marrow Stromal Stem Cells, Mesodermal Progenitor Cells). Они являются гетерогенной клеточной популяцией. Эти клетки могут быть изолированы от

прочих элементов костного мозга и размножены в условиях *in vitro*. Учитывая способность мезенхимальных стволовых клеток дифференцироваться под соответствующей индукцией в зрелые соединительнотканые клетки, исследователи предприняли успешные попытки их применения для восстановления дефектов соединительных тканей. A.R. Derubeis и R. Cancedda, оперируя литературными данными, утверждают, что при замещении дефектов костной ткани биокерамическими имплантатами, нагруженными мезенхимальными стволовыми клетками, процент формирования костного сращения выше, чем в случаях имплантации биокерамических материалов, не комбинированных с упомянутыми клетками.

Применение мезенхимальных стволовых клеток может открыть новые горизонты в травматологии и ортопедии, трансплантологии и пластической хирургии, однако существует множество нерешенных вопросов относительно оптимальных способов получения этих клеток, их культивации, оптимальных способов доставки в трансплантационное ложе, сочетания стволовых клеток с факторами роста [38, 39].

#### *Экспериментальный спондилодез с применением факторов роста*

На сегодняшний день накоплен достаточный экспериментальный опыт для оценки эффективности тех или иных стратегий в достижении жесткого костного сращения позвонков посредством применения искусственных заместителей костной ткани и остеоиндуктивных агентов (факторов роста костной ткани).

Определены наиболее практичные экспериментальные модели, проведены сравнения эффективности различных факторов роста костной ткани в контролируемых исследованиях, определена их оптимальная доза (табл. 2), обсуждены вопросы гистологической характеристики новообразованной костной ткани, а также безопасности применения факторов роста.

Наиболее ранние работы, посвященные применению факторов роста в современных трехмерных носителях, датируются второй половиной 1990-х гг. Исследования продолжаются, данные регулярно публикуются в литературе последних лет.

Наиболее частой экспериментальной моделью является межпоперечный билатеральный спондилодез в поясничном отделе лабораторного животного с применением тех или иных искусственных пластических материалов в сравнении с аутологичной костной тканью.

Таблица 2

## Сравнительный анализ эффективности синтетических заместителей при формировании костного блока между позвонками

Лабораторные животные	Носители факторов роста	Факторы роста / Остеоиндуктивное воздействие	Уровень	Фиксация на уровне спондилодеза	Модель спондилодеза	Число наблюдений	Частота формирования костного блока			Авторы
							n	г, %	t, нед.	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Кролики	3 см <sup>3</sup> гранул HA (Pro Osteon 500®)	1,5 мл ABM	L5 – L6	Нет	I	14	0	0	5	S. D. Boden et al., 1999.
Кролики	1,5 см <sup>3</sup> гранул HA и 1,5 мл аутокости	Нет	L5 – L6	Нет	I	14	7	50	5	
Кролики	3 см <sup>3</sup> гранул HA	500 мкг NEOSTEO (NeOsteo®)	L5 – L6	Нет	I	11	11	100	5	
Макаки Резус	5 см <sup>3</sup> аутологичной костной ткани	Нет	L4 – L5	Нет	I	4	0	0	24	S. D. Boden* et al., 1999.
Макаки Резус	2 HA/β-TCP блока (4,44 см <sup>3</sup> )	Нет	L4 – L5	Нет	I	2	2	100	24	
Макаки Резус	2 HA/β-TCP блока (4,44 см <sup>3</sup> )	6, 9, и 12 мг rhBMP-2	L4 – L5	Нет	I	15	15	100	24	
Кролики	2 г биокерамических гранул (Pro Osteon 500R®)	30 млн. MSC	L4 – L5	Нет	I	7	6	86	8	G. Cinotti et al., 2004.
Кролики	2 г биокерамических гранул	10 мл ABM	L4 – L5	Нет	I	8	4	50	8	
Кролики	2 г биокерамических гранул	Нет	L4 – L5	Нет	I	10	3	30	8	
Кролики	2 г аутологичной кости	Нет	L4 – L5	Нет	I	8	2	25	8	
Кролики	2,5 г аутокости + пластина из коллагена I типа	Нет	L4 – L5	Нет	I	7	4	57	6	A. Minamide et al., 2005.
Кролики	2,5 г HA гранул + пластина из коллагена I типа	100 мкг rhBMP-2	L4 – L5	Нет	I	7	7	100	6	
Кролики	2,5 г HA гранул + пластина из коллагена I типа	2,5×10 <sup>6</sup> KABM	L4 – L5	Нет	I	7	0	0	6	
Кролики	2,5 г HA гранул + пластина из коллагена I типа	2,5×10 <sup>8</sup> KABM	L4 – L5	Нет	I	7	5	71	6	
Крысы	0,3 см <sup>3</sup> FHA	Нет	L5 – L6	Нет	I	5	0	0	8	H. Morisue et al., 2006.
Крысы	0,3 см <sup>3</sup> FHA	5 мкг rhBMP-2	L5 – L6	Нет	I	8	7	88	8	
Крысы	0,3 см <sup>3</sup> FHA	10 мкг rhBMP-2	L5 – L6	Нет	I	5	4	80	8	
Крысы	0,3 см <sup>3</sup> FHA	5 мкг rhBMP-2	L5 – L6	Нет	I	6	2	33	8	
Крысы	0,3 см <sup>3</sup> FHA	10 мкг rhBMP-2	L5 – L6	Нет	I	5	4	80	8	
Кролики	Без таковых	Нет	L4 – L5	Нет	I	10	0	0	6	J. D. Smucker et al., 2008.
Кролики	3 см <sup>3</sup> крошки аутологичной кости	Нет	L4 – L5	Нет	I	8	5	63	6	
Кролики	3 см <sup>3</sup> смеси (1:1) крошек аутокости и биокер. гранул	Нет	L4 – L5	Нет	I	10	3	33	6	
Кролики	3 см <sup>3</sup> смеси (1:1) крошек аутокости и биокер. гранул	50 мкг B2A2-K-NS на 1 см <sup>3</sup> смеси	L4 – L5	Нет	I	9	7	78	6	
Кролики	3 см <sup>3</sup> смеси (1:1) крошек аутокости и биокер. гранул	100 мкг B2A2-K-NS на 1 см <sup>3</sup> смеси	L4 – L5	Нет	I	9	8	89	6	
Кролики	3 см <sup>3</sup> смеси (1:1) крошек аутокости и биокер. гранул	300 мкг B2A2-K-NS на 1 см <sup>3</sup> смеси	L4 – L5	Нет	I	10	8	80	6	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Кролики	Без таковых	Нет	L5 – L6	Да	II	6	0	0	12	T. Kai et al., 2003.
Кролики	Аутологичная кость	Нет	L5 – L6	Да	II	6	4	67	12	
Кролики	Блок пористой HA/ТСР биокерамики (5×5×5 мм)	Нет	L5 – L6	Да	II	6	3	50	12	
Кролики	Блок пористой HA/ТСР биокерамики (5×5×5 мм)	1×10 <sup>6</sup> OB	L5 – L6	Да	II	6	6	100	12	
Кролики	Блок пористой HA/ТСР биокерамики (5×5×5 мм)	1×10 <sup>6</sup> OB + 500 мкг rhBMP-2	L5 – L6	Да		6	6	100	12	
Атимические крысы	DBX	Нет	L4-L5	Нет	I	5	1	20	4	Yuan W. Et al., 2013
Атимические крысы	DBX	10 мкг NELL-1	L4-L5	Нет	I	4	4	100	4	
Атимические крысы	DBX	50 мкг NELL-1	L4-L5	Нет	I	5	4	100	4	
Атимические крысы	ACS	Нет	L4-L5	Нет	I	2	0	0	4	
Атимические крысы	ACS	90 мкг rhBMP-2	L4-L5	Нет	I	5	5	100	4	
Атимические крысы	ABT	нет	L4-L5	Нет	I	5	0	0	4	
Кролики	Композит из коллагена и HA и β-ТСР	Нет	L4-L5	Нет	I	12	6	50	12	Liao J. C., 2016
Кролики	Композит из коллагена и HA и β-ТСР	MSC	L4-L5	Нет	I	12	8	67	12	
Кролики	Композит из коллагена и HA и β-ТСР	Линия MSC, экспрессирующая BMP-7	L4-L5	Нет	I	12	12	100	12	
Собаки	Блоки пористой HA/β-ТСР биокерамики (2 см <sup>3</sup> )	50 мкг rhBMP-2	L1-L2 и L4-L5	Нет	I	н/д	н/д	15	8	Zheng G. B. et al., 2017
Собаки	Блоки пористой HA/β-ТСР биокерамики (2 см <sup>3</sup> )	50 мкг Activin A/BMP-2 (AB204)	L1-L2 и L4-L5	Нет	I	н/д	н/д	90	8	

Сокращения, используемые в таблице:

I – заднебоковой межпоперечный спондилодез; II – передний межтеловой спондилодез  
n – число случаев образования костного блока между позвонками в экспериментальной группе  
r – доля случаев образования костного блока, выраженная в процентах  
t – время (в неделях), прошедшее от дня операции до момента констатации n случаев образования костного блока  
н/д – источник не содержит требуемых данных  
BM – аутологичный костный мозг  
ОКП – экстракт остеоиндуктивного костного протеина (NeOsteo®, Sulzer Orthopedics Biologics)  
MSC – стволовые мезенхимальные клетки  
ККМ – культивированные клетки костного мозга  
НАМ – пористый имплантат из HA волокон с размерами пор 100 мкм с общей пористостью 98%  
НАВ – пористый биокерамические имплантат на основе HA с размерами пор 100 мкм и пористостью 55%  
ОБ – остеобласты  
АКТ – аутологичный костный трансплантат  
АСС – резорбируемая коллагеновая губка  
NELL-1 – Nel-подобная молекула 1, фактор роста костной ткани (Nel-like molecule-1)  
AB204 – химеры из Активина-А (Activine-A) и rhBMP-2

Коллектив авторов во главе с S.D. Boden исследовали остеогенез при заднебоковом спондилодезе в поясничном отделе лабораторных животных с имплантацией кораллового гидроксиапатита, несущего факторы роста костной ткани. В одной группе животных производилась имплантация 3 мл гранул кораллового НА с диаметром от 2 до 5 мм (Pro Osteon 500®, Inerpore International) и 1,5 мл аспирата аутологичного костного мозга, в другой группе – смеси 1,5 мл гранул НА и 1,5 мл аутологичной компактной и губчатой кости; в третьей – блоков с размерами 12 × 30 × 2,5 мм, полученных после лиофилизации пасты, состоящей из 3 мл гранул НА, 500 мкг экстракта остеоиндуктивного костного протеина (NeOsteo®, Sulzer Orthopedics Biologics) и 3%-ной дисперсии бычьего коллагена I типа [40]. Наиболее часто костный отмечен в третьей группе (табл. 2).

Позже при участии того же автора была опубликована работа, в которой на макаках Резус изучался процесс сращения позвонков с применением следующих материалов: 1) 5 см<sup>3</sup> аутологичной костной ткани; 2) пористых блоков композитной кальцийфосфатной биокерамики на основе НА (60%) и β-ТСР (40%) с общей пористостью 70% и размерами 12×5×37 мм и объемом 2,22 см<sup>3</sup> (Sofomor-Danek Group); 3) пористых биокерамических блоков, нагруженных человеческим рекомбинантным костным морфогенетическим белком 2 (rhBMP-2, Genetics Institute, Cambridge) в дозе 6, 9 и 12 мг. Для оценки безопасности использования биокерамических блоков, нагруженных rhBMP-2, спондилодез был дополнен ламинэктомией для того, чтобы оценить исходы лечения при условии близкого расположения к дуральному мешку имплантата. Все животные выводились из эксперимента спустя 24 недели после имплантации. Производилась рентгенлучевая, пальпаторная и гистологическая оценка результатов. При гистологическом изучении биокерамических блоков без rhBMP-2 установлено, что костная ткань вращалась только в их поверхность. В тех случаях, когда блоки несли в себе rhBMP-2, наблюдалось дозозависимое увеличение количества костной ткани, которая занимала все пространство внутри блоков. Авторы констатировали отсутствие значимого проникновения новообразованной кости в позвоночный канал.

Последние заключили о том, что использование указанных биокерамических блоков в качестве носителей rhBMP-2 является эффективным и безопасным – даже при наличии дефекта в поле ламинэктомии не было отмечено признаков костной индукции за пределами биокерамических блоков [41].

Т. Kai и соавторы на модели межтелового спондилодеза в поясничном отделе позвоночника кроликов с фиксацией суставных отростков смежных позвонков пластиной изучили эффективность применения пористой биокерамики, комбинированной с остеобластами. Примененный материал был композитным и состоял на 60% из НА и 40% из

ТСР, общая пористость материала находилась в диапазоне 60–70%, а размер пор – от 300 до 600 мкм. Имплантат имел кубическую форму, размер ребра равнялся 5 мм. Остеобласты были изолированы и культивированы из аутологичного костного мозга животных. В одной из групп животных авторы применили 500 мкг rhBMP-2 вместе с биокерамическим носителем остеобластов. Группы животных, а также результаты исследования приведены в таблице 2. Авторы сделали вывод о том, что пористые керамические блоки, несущие в себе культуру остеобластов, могут иметь сравнимые результаты с аутологичной костной тканью. Добавление рекомбинантного человеческого морфогенетического протеина 2 увеличивало прочность сращения позвонков [42].

Применение синтетических костных заместителей может решить проблемы, связанные с забором аутологичной кости. Однако по литературным данным использование этих материалов, обладающих только остеоиндуктивностью, не ведет к образованию достаточно крепкого костного сращения. А. Koga и коллеги провели исследование на 6-недельных кроликах массой 3 кг, в котором остеоиндуктивные биокерамические имплантаты были комбинированы с остеоиндуктивными агентами. Все операции были произведены под общей анестезией с применением нембутала в дозе 1,2 мл/кг массы тела. Было проведено два эксперимента. В первом в качестве имплантатов служили: 1) пористые биокерамические цилиндры диаметром 4 мм и длиной 20 мм на основе HA (HA stick, PENTAX Inc.) с общей пористостью 70%; 2) те же цилиндры, но нагруженные 1 мл аспирата костного мозга. Имплантаты были внедрены в мышцы спины подопытных животных и спустя 6 недель извлечены. При гистологическом исследовании установлено, что количество новообразованной костной ткани в порах HA цилиндров, нагруженных костным мозгом, было статистически достоверно больше, чем в имплантатах без нагрузки клетками. Биомеханическое тестирование материалов показало меньшую жесткость последних.

Во втором эксперименте производился моносегментарный межпоперечный односторонний спондилодез с применением следующих типов материалов: 1) 2 г подвздошной аутокости; 2) 2 г локальной аутологичной кости (из поперечных отростков); 3) 1 цилиндр HA и 1 г подвздошной аутокости; 4) 2 HA цилиндра, каждый из которых пропитан 1 мл аспирата костного мозга; 5) только 2 HA цилиндра; 6) 2 HA цилиндра, каждый из которых пропитан 1 мл аспирата костного мозга, и 2,5 мкг фибронектина, полученного из плазмы крови кроликов. Через задний доступ были скелетированы и декортицированы поперечные отростки четвертого и пятого поясничных позвонков (только с одной стороны, в отличие от предыдущей модели исследований). После этого в пространство между отростками были внедрены указанные выше материалы. Спустя 6 недель после операции животные выводились из эксперимента, производилась биомеханическая и гистологическая

оценка костного блока. Сращение между позвонками при имплантации аутологичной подвздошной кости было прочнее и эластичнее по сравнению с костным блоком, сформированным при имплантации локальной аутокости и НА цилиндров с костномозговой пропиткой или без нее; костный блок, полученный при применении НА цилиндров, пропитанных костным мозгом и фибронектином, был прочнее, чем таковой при имплантации ГАП блоков с костномозговой нагрузкой или без нее. При использовании НА цилиндров, пропитанных фибронектином и аспирином костного мозга, остеогенез и прочность костного сращения позвонков достигали аналогичных параметров при спондилодезе с применением подвздошной аутокости. Авторы объясняют последнее тем, что фибронектин увеличивает нагружаемость пористой НА биокерамики мезенхимальными стволовыми клетками, что улучшает процесс образования костной ткани и прочность костного сращения [43].

G. Cinotti и коллеги на кроликах исследовали следующие материалы: 1) 2 г пористых резорбируемых гранул из композитной кальцийфосфатной биокерамики на основе фосфата кальция (80%) и НА (20%) с диаметром от 1 до 4 мм и размерами пор 200–400 мкм (Pro Osteon 500R®, Irvin), нагруженные примерно 30 млн стволовых мезенхимальных клеток; 2) 2 г биокерамических гранул и 10 мл аутологичного костного мозга; 3) только 2 г гранул; 4) 2 г губчатой и компактной аутологичной кости. Биокерамические гранулы во всех случаях предварительно были пропитаны раствором, содержащим фибронектин в дозе 100 мг/мл (Fibronectin cellular from human foreskin fibroblast; Sigma-Aldrich), что увеличивало адгезивность их поверхности. Стволовые мезенхимальные клетки были изолированы из аспириата костного мозга животных и культивировались в условиях *in vitro*, во время чего производилась индукция их дифференцировки в клетки – предшественники остеобластов добавлением дексаметазона. Животные выводились из эксперимента спустя 8 недель после имплантации. Производилась пальпаторная, рентгенлучевая и гистологическая оценка костного сращения между позвонками. Результаты отражены в столбце 8 таблицы 2 [44].

A. Minamide и соавторы провели исследование на кроликах, в котором для проведения спондилодеза на уровне L4 – L5 позвонков были использованы следующие материалы в комбинации с пластиной (1 × 2 × 5 см, Koken Co.) из бычьего коллагена I типа: 1) 2,5 г губчатой и компактной аутологичной кости, забранной из подвздошного гребня; 2) 2,5 г пористых гранул НА биокерамики (Mitsubishi Material Co.) и 100 мкг rhBMP-2 (Yamanouchi Pharmaceutical Co.); 3) 2,5 г НА гранул и 2,5 мл геля из коллагена I типа, содержащего  $1 \times 10^6$  культивированных клеток костного мозга в 1 мл; 4) 2,5 г НА гранул и 2,5 мл геля из коллагена I типа, содержащего  $1 \times 10^8$  культивированных клеток костного мозга в 1 мл. Спустя 6 недель после операции животные были выведены из эксперимента. Наличие

костных сращений между позвонками было подтверждено пальпаторно, рентгенологическим и гистологическим методами [45].

Н. Morisue и коллеги провели экспериментальный спондилодез в поясничном отделе позвоночника крыс на уровне L5 – L6. Авторами применены следующие материалы: пористый имплантат из HA волокон с размерами пор 100 мкм с общей пористостью 98% (НАМ); пористый биокерамический имплантат на основе HA с размерами пор 100 мкм и пористостью 55% (НАВ). Материалы были нагружены 5 или 10 мкг rhBMP-2. Подсчет количества случаев со сформированным костным блоком между позвонками производился спустя 8 недель после их имплантации путем пальпации позвоночника на уровне спондилодеза. Кроме того, Н. Morisue и коллеги предварительно изучили способность нагруженных имплантатов высвобождать фактор роста в условиях *in vitro* (экспозиция в фосфатном буфере). Оценивая результаты исследования, авторы сделали выводы о том, что волокнистый имплантат в *in vitro* условиях в течение 28 дней высвобождал большее количество rhBMP-2, чем пористая биокерамика; в сравниваемых группах в рамках *in vivo* эксперимента число сформированных костных блоков было больше, а новообразованная костная ткань была плотнее в тех местах, где был применен НАМ, нагруженный rhBMP-2. Таким образом, авторы заключили, что пористый имплантат, состоящий из волокон HA, является эффективным носителем костного морфогенетического белка 2 [46].

J. D. Smucker и соавторы для экспериментального спондилодеза на уровне L4 – L5 позвоночника кроликов применили пористые гранулы композитной кальцийфосфатной биокерамики на основе HA (20%) и трикальцийфосфата (80%) от 1 до 2 мм в диаметре со средним размером пор 400 мкм и общей пористостью 75%, которые авторами были покрыты B2A2-K-NS пептидом, обладающим способностью потенцировать действие BMP-2. Действие B2A2-K-NS заключается в соединении с BMPR-I рецепторами клеток-предшественников в присутствии BMP-2, что приводит к совместной активизации процессов фосфорилирования в них, в конечном итоге вызывающих их дифференцировку в остеобласты. Покрытие гранул пептидом производилось непосредственно перед их имплантацией следующим путем: погружение первых в раствор, содержащий B2A2-K-NS, смешивание на качающейся платформе в течение 20 минут. Оценка результатов производилась спустя 6 недель после операции. Результаты приведены в таблице 2 [47].

В 2002 г. rhBMP-2 был разрешен в клинической практике в США, после чего были накоплены опыт клинической эффективности данного фактора роста, а также сведения о негативных эффектах, среди которых – стимуляция локального роста жировой ткани и образование кистевидных пустот костной ткани, эктопическое формирование костной ткани и прямая стимуляция остеокластической костной резорбции. Наиболее неблагоприятным

среди отмеченных эффектов является индукция локального воспаления, что в случае применения rhBMP-2 в шейном уровне приводило к жизнеугрожающему отеку тканей. Все это поддерживает интерес исследователей к поиску новых факторов роста с превосходящими свойствами.

Так, Yuan W. и соавторы продемонстрировали экспериментальное применение нового фактора роста NELL-1 (Nel-like molecule-1, Nel-подобная молекула 1), NELL-1 впервые обнаружен коллективом автором во главе с Ting K. в 1999 г. в локусах активного остеогенеза у пациентов при проведении односторонней хирургической коррекции лобного синостоза. На модели межпоперечного спондилодеза авторам удалось продемонстрировать высокую эффективность NELL-1 в сравнении с rhBMP-2 (табл. 2). В то же время при гистологическом исследовании костных блоков отмечено, что при использовании первого фактора роста имелась интенсивная энхондральная оссификация, в то время как при rhBMP-2 отмечалась костная ткань с жировыми включениями [48].

Другой попыткой ограничить побочные эффекты клинического применения rhBMP-2 и rhBMP-7, связанные с необходимой высокой дозой факторов роста, проявляющиеся в виде выраженного локального воспалительного ответа и эктопической оссификацией, является создание векторов мезенхимальных стволовых клеток, постоянно экспрессирующих фактор роста. Так, Jen-Chung Liao продемонстрировал применение бакуловирусных векторов мезенхимальных стволовых клеток, экспрессирующих rhBMP-7, в достижении межпоперечного спондилодеза в поясничном отделе кроликов [49]. Результаты исследования представлены в таблице 2.

G. Zheng и коллеги продемонстрировали еще один путь снижения дозы rhBMP при одновременном сохранении высокой эффективности применения в достижении костного сращения, который заключался в применении химеры из Активина-A (Activine-A) и rhBMP-2. На модели межпоперечного спондилодеза поясничного отдела позвоночника собак им удалось доказать более высокую эффективность (табл. 2) предложенной химеры [50].

### **Заключение**

Применение факторов роста открывает новые возможности в травматологии и ортопедии, позволяющие легко выйти из трудноразрешимой ситуации, создать наилучшие условия для формирования костной ткани, ускорить этот процесс.

Исследования на различных моделях спондилодеза показали, что частота гистологически подтвержденных случаев образования костного блока с применением синтетических заместителей костной ткани с факторами роста по сравнению с аутологичной костной тканью может быть даже больше. Для улучшения остеогенеза применялись клетки аспирата аутологичного костного мозга, мезенхимальные стволовые клетки и их векторы,

экспрессирующие rhBMP-7. Среди применяемых факторов роста на этапе эксперимента отмечены: костный протеин NeOsteo®, rhBMP-2, rhBMP-7, B2A2-K-NS пептид, факторы роста NELL-1.

Высокие дозы rhBMP-2 и rhBMP-7, необходимые для достижения спондилодеза, разрешенные в клинической практике ряда стран, обуславливают такие побочные эффекты, как стимуляция локального роста жировой ткани и образование кистевидных пустот костной ткани, эктопическое формирование костной ткани и прямая стимуляция остеокластической костной резорбции, а также индукция локального воспаления, что в случае применения факторов роста в шейном отделе позвоночника может привести к жизнеугрожающему отеку тканей.

Предприняты эффективные экспериментальные попытки по снижению минимально необходимых доз rhBMP-2 и rhBMP-7, заключающиеся в создании генно-инженерных векторов мезенхимальных стволовых клеток, экспрессирующих факторы роста, созданы химеры на основе rhBMP-2.

Найден и апробирован новый фактор роста костной ткани NELL-1, превосходящий своими свойствами rhBMP-2.

### Список литературы

1. Stark J.R., Hsieh J., Waller D. Bone Graft Substitutes in Single or Double Level Anterior Cervical Discectomy and Fusion: A Systematic Review. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2018. V. 1. DOI:10.1097/BRS.0000000000002925.
2. Park J.Y., Park S.H., Kim M.G., Park S.H., Yoo T.H., Kim M.S. Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol*. 2018. V. 1064. P. 109-121. DOI:10.1007/978-981-13-0445-3\_7.
3. Pesenti S., Ghailane S., Varghese J.J., Ollivier M., Peltier E., Choufani E., Bollini G., Blondel B., Jouve J.L. Bone substitutes in adolescent idiopathic scoliosis surgery using sublaminar bands: is it useful? A case-control study. *Int Orthop*. 2017. V. 41 (10). P. 2083-2090. DOI:10.1007/s00264-017-3512-4.
4. Cho J.H., Lee J.H., Yeom J.S., Chang B.S., Yang J.J., Koo K.H., Hwang C.J., Lee K.B., Kim H.J., Lee C.K., Kim H., Suk K.S., Nam W.D., Han J. Efficacy of Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 in posterolateral lumbar fusion: an open, active-controlled, randomized, multicenter trial. *Spine J*. 2017. V. 17 (12). P. 1866-1874. DOI:10.1016/j.spinee.2017.06.023.

5. Russell T.A., Insley G. Bone Substitute Materials and Minimally Invasive Surgery: A Convergence of Fracture Treatment for Compromised Bone. *Orthop Clin North Am.* 2017. V. 48 (3). P. 289-300.
6. Stark J.R., Hsieh J., Waller D. Bone Graft Substitutes in Single or Double Level Anterior Cervical Discectomy and Fusion: A Systematic Review. *Spine.* 2018. V. 1. DOI:10.1097/BRS.000000000000292.
7. Ishikawa K., Miyamoto Y., Tsuchiya A., Hayashi K., Tsuru K., Ohe G. Physical and Histological Comparison of Hydroxyapatite, Carbonate Apatite, and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Bone Substitutes. *Materials (Basel).* 2018. V. 16;11(10). pii: E1993. DOI:10.3390/ma11101993.
8. Siddiqui H.A., Pickering K.L., Mucalo M.R. A Review on the Use of Hydroxyapatite-Carbonaceous Structure Composites in Bone Replacement Materials for Strengthening Purposes. *Materials (Basel).* 2018. V. 24;11(10). pii: E1813. DOI:10.3390/ma11101813.
9. Ghayor C., Weber F.E. Osteoconductive Microarchitecture of Bone Substitutes for Bone Regeneration Revisited. *Front Physiol.* 2018. V. 19;9. P. 960. DOI:10.3389/fphys.2018.00960.
10. Rerikh V.V., Avetisyan A.R., Zaydman A.M., Anikin K.A., Bataev V.A., Nikulina A.A., Sadovoy M.A., Aronov A.M., Semantsova E.S. Osseointegration of alumina bioceramic granules: a comparative experimental study AIP Conference Proceedings 2016. C. 020055.
11. Munhoz M.A.S., Hirata H.H., Plepis A.M.G., Martins V.C.A., Cunha M.R. Use of collagen/chitosan sponges mineralized with hydroxyapatite for the repair of cranial defects in rats. *Injury.* 2018. V. 20. pii: S0020-1383(18)30520-5. DOI:10.1016/j.injury.2018.09.018.
12. Tsai S.W., Yu W.X., Hwang P.A., Huang S.S., Lin H.M., Hsu Y.W., Hsu F.Y. Fabrication and Characterization of Strontium-Substituted Hydroxyapatite-CaO-CaCO<sub>3</sub> Nanofibers with a Mesoporous Structure as Drug Delivery Carriers. *Pharmaceutics.* 2018. V. 8;10(4). pii: E179. DOI:10.3390/pharmaceutics10040179.
13. Pihlman H., Keränen P., Paakinaho K., Linden J., Hannula M., Manninen I.K., Hyttinen J., Manninen M., Laitinen-Vapaavuori O. Novel osteoconductive  $\beta$ -tricalcium phosphate/poly(L-lactide-co-e-caprolactone) scaffold for bone regeneration: a study in a rabbit calvarial defect. *J Mater Sci Mater Med.* 2018. V. 8;29(10). P. 156. DOI:10.1007/s10856-018-6159-9.
14. Leventis M., Fairbairn P., Mangham C., Galanos A., Vasiliadis O., Papavasileiou D., Horowitz R. Bone Healing in Rabbit Calvaria Defects Using a Synthetic Bone Substitute: A Histological and Micro-CT Comparative Study. *Materials (Basel).* 2018. V. 17;11(10). pii: E2004. DOI:10.3390/ma11102004.
15. Neto A.S., Ferreira J.M.F. Synthetic and Marine-Derived Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel).* 2018. V. 13;11(9). pii: E1702. DOI:10.3390/ma11091702.

16. Jung-Ho Park, Yoon-Kwang Bae, Seung-Woo S., Jae-Hyuk Y., Jae-Young H. Efficacy of cortico/cancellous composite allograft in treatment of cervical spondylosis. *Medicine (Baltimore)*. 2017. V. 96(33): e7803. Published online 2017 Aug 18. doi:10.1097/MD.00000000000007803. PMID: 28816974.
17. Kar S., Molla M.D.S, Katti D.R., Katti K.S. Tissue-engineered nanoclay based 3D in vitro breast cancer model for studying breast cancer metastasis to bone. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018. V. 22. DOI:10.1002/term.2773.
18. Li D., Zhang K., Shi C., Liu L., Yan G., Liu C., Zhou Y., Hu Y., Sun H., Yang B. Small molecules modified biomimetic gelatin/hydroxyapatite nanofibers constructing an ideal osteogenic microenvironment with significantly enhanced cranial bone formation. *Int J Nanomedicine*. 2018. V. 6;13. P. 7167-7181. DOI:10.2147/IJN.S174553. eCollection 2018.
19. Palaveniene A., Tamburaci S., Kimna C., Glambaite K., Baniukaitiene O., Tihminlioglu F., Liesiene J. Osteoconductive 3D porous composite scaffold from regenerated cellulose and cuttlebone-derived hydroxyapatite. *J. Biomater Appl*. 2018. V. 19:885328218811040. DOI:10.1177/0885328218811040.
20. Hu K., Olsen B.R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 2016. V. 91. P. 30-8. DOI:10.1016/j.bone.2016.06.013.
21. Haneef K., Ali A., Khan I., Naeem N., Jamall S., Salim A. Role of IL-7 in Fusion of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Cardiomyocytes in vitro and Improvement of Cardiac Function in vivo. *Cardiovasc Ther*. 2018. V. 19. e12479. DOI:10.1111/1755-5922.12479.
22. Kolk A., Boskov M., Haidari S., Tischer T., van Griensven M., Bissinger O., Plank C. J. Comparative analysis of bone regeneration behavior using recombinant human BMP-2 versus plasmid DNA of BMP-2. *Biomed Mater Res A*. 2018. V. 25. DOI:10.1002/jbm.a.36545.
23. Ishida W., Ramhmdani S., Xia Y., Kosztowski T.A., Xu R., Choi J., De la Garza Ramos R., Elder B.D., Theodore N., Gokaslan Z.L., Sciubba D.M., Witham T.F., Bydon A., Wolinsky J.P., Lo S.L. Use of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 at the C1-2 Lateral Articulation Without Posterior Structural Bone Graft in Posterior Atlantoaxial Fusion in Adult Patients. *World Neurosurg*. 2018. V. 15. pii: S1878-8750(18)32584-1. DOI:10.1016/j.wneu.2018.11.037. [Epub ahead of print] PMID: 30448576.
24. Rolvien T., Barbeck M., Wenisch S., Amling M., Krause M. Cellular Mechanisms Responsible for Success and Failure of Bone Substitute Materials. *Int J Mol Sci*. 2018. V. 23;19(10). pii: E2893. DOI:10.3390/ijms19102893.
25. Köse S., Kankilic B., Gizer M., Ciftci Dede E., Bayramli E., Korkusuz P., Korkusuz F. Stem Cell and Advanced Nano Bioceramic Interactions. *Adv Exp Med Biol*. 2018. V. 1077. P. 317-342. DOI:10.1007/978-981-13-0947-2\_17.

26. Li G., Li P., Chen Q., Thu H.E., Hussain Z. Current updates on bone grafting biomaterials and recombinant human growth factors implanted biotherapy for spinal fusion: A review of human clinical studies. *Curr. Drug. Deliv.* 2018. V. 24. DOI:10.2174/1567201815666181024142354.
27. Smith K.A., Russo G.S., Vaccaro A.R., Arnold P.M. Scientific, Clinical, Regulatory, and Economic Aspects of Choosing Bone Graft/Biological Options in Spine Surgery. *Neurosurgery.* 2018. V. 19. DOI:10.1093/neuros/nyy322.
28. Morris M.T., Tarpada S.P., Cho W. Bone graft materials for posterolateral fusion made simple: a systematic review. *Eur Spine J.* 2018. V. 27(8). P. 1856-1867. DOI:10.1007/s00586-018-5511-5516.
29. Singh M., Berkland C., Detamore M. S. Strategies and Applications for Incorporating Physical and Chemical Signal Gradients in Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008. V. 14(4). P. 341 – 366.
30. Bose S., Darsell J., Hosick H. L., Yang L., Sarkar D. K., Bandyopadhyay A. Processing and characterization of porous alumina scaffolds. *J. Mater Sci: Mater Med.* 2002. V. 13. P. 23–28.
31. Alexander D., Hoffmann J., Munz A., Friedrich B., Geis-Gerstorfer J., Reinert S. Analysis of OPLA scaffolds for bone engineering constructs using human jaw periosteal cells. *J. Mater Sci: Mater Med.* 2008. V. 19. P. 965–974.
32. Palaveniene A., Tamburaci S., Kimna C., Glambaite K., Baniukaitiene O., Tihminlioglu F., Liesiene J. Osteoconductive 3D porous composite scaffold from regenerated cellulose and cuttlebone-derived hydroxyapatite. *J. Biomater. Appl.* 2018. Nov 19:885328218811040. DOI:10.1177/0885328218811040.
33. 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. V. 6 (2). P. 90-99.
34. Spinks K., Scaffidi J.J. In Vivo Osteoinduction: Evaluating 2-Beta Coxatene as an Immunoinductive Compound and Novel Ingredient for Joint Support. *Integr Med (Encinitas).* 2016. V. 15(5). P. 34–44. PMID: 27980494.
35. Miron R.J., Zhang Y.F. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res.* 2012. V. 91 (8). P. 736-44. DOI:10.1177/0022034511435260.
36. Paulo M.J.E., Dos Santos M.A., Cimatti B., Gava N.F., Riberto M., Engel E.E. Osteointegration of porous absorbable bone substitutes: A systematic review of the literature. *Clinics (Sao Paulo).* 2017. V. 72 (7). P. 449-453. DOI:10.6061/clinics/2017(07)10.
37. Capanna R., De Biase P. Osteoinduction: Basic Principles and Developments. *Practice of Intramedullary Locked Nails.* Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. 308 p. DOI:10.1007/3-540-32345-7.

38. Derubeis A.R., Cancedda R. Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) in Bone Engineering: Limitations and Recent Advances *Annals of Biomedical Engineering*. 2004. V. 32. No. 1. P. 160–165.
39. Pountos I., Jones E., Tzioupis C., McGonagle D., Giannoudis P. V. Growing bone and cartilage. *J Bone Joint Surg*. 2006. V. 88-B. P. 421–426.
40. Boden S.D., Martin G.J.Jr, Morone M., Ugbo J.L., Titus L., Hutton W.C. The Use of Coralline Hydroxyapatite with Bone Marrow, Autogenous Bone Graft, or Osteoinductive Bone Protein Extract for Posterolateral Lumbar Spine Fusion. *Spine*. 1999. V. 24. No. 4. P. 320–327.
41. Boden S.D., Martin G.J.jr, Morone M.A., Ugbo J.L., Moskovitz P.A. Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine*. 1999. V. 24. No. 12. P. 1179–1185.
42. Kai T., Shao-qing G., Geng-ting D. In Vivo Evaluation of Bone Marrow Stromal-Derived Osteoblasts-Porous Calcium Phosphate Ceramic Composites as Bone Graft Substitute for Lumbar Intervertebral Spinal Fusion. *Spine*. 2003. V. 28. No. 15. P. 1653–1658.
43. Koga A., Tokuhashi Y., Ohkawa A. Effects of Fibronectin on Osteoinductive Capability of Fresh Iliac Bone Marrow Aspirate in Posterolateral Spinal Fusion in Rabbits Koga *Spine*. 2008. V. 33. No. 12. P. 1318–1323.
44. Cinotti G., Patti A.M., Vulcano A. Experimental posterolateral spinal fusion with porous ceramics and mesenchymal stem cells *J Bone Joint Surg*. 2004. V. 86-B. P. 135–142.
45. Minamide A., Yoshida M., Kawakami M. The Use of Cultured Bone Marrow Cells in Type I Collagen Gel and Porous Hydroxyapatite for Posterolateral Lumbar Spine Fusion. *Spine* 2005. V. 30. No. 10. P. 1134 – 1138.
46. Morisue H. Matsumoto M., Chiba K. A novel Hydroxyapatite Fiber Mesh as a Carrier for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Enhances Bone Union in Rat Posterolateral Fusion Model. *Spine*. 2006. V. 31.No 11. P. 1194 – 1200.
47. Smucker J.D., Bobst J.A., Petersen E.B., Nepola J.V., Fredericks D.C. B2P Peptide on Ceramic Granules Enhance Posterolateral Spinal Fusion in Rabbits Compared With Autograft. *Spine*. 2008. V. 33. No. 12. P. 1324 – 1329.
48. Yuan W., James A.W., Asatrian G., Shen J., Zara J.N., Tian H.J., Siu R.K., Zhang X., Wang J.C., Dong J. NELL-1 based demineralized bone graft promotes rat spine fusion as compared to commercially available BMP-2 product. *J. Orthop. Sci.* 2013. V. 18(4). P. 646-57. DOI:10.1007/s00776-013-0390-5.

49. Liao J. C. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expressing Baculovirus-Engineered Bone Morphogenetic Protein-7 Enhance Rabbit Posterolateral Fusion. *Int. J. Mol. Sci.* 2016 Jul 5;17(7). pii: E1073. DOI:10.3390/ijms17071073.
50. Zheng G.B., Yoon B.H., Lee J.H. Comparison of the osteogenesis and fusion rates between activin A/BMP-2 chimera (AB204) and rhBMP-2 in a beagle's posterolateral lumbar spine model. *Spine J.* 2017 Oct; 17(10):1529-1536. DOI:10.1016/j.spinee.2017.05.014.